

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz
(Komm. Direktor Prof. Dr. E. Muscholl)

Untersuchungen zum spektralen Verhalten
und zur enzymatischen Aktivität von
Rattenlebermikrosomen nach Behandlung
mit Nagarse

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Franz Niedermeier
aus Vilsbiburg

Mainz 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552610_0079

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz
(Komm. Direktor Prof. Dr. E. Muscholl)

**Untersuchungen zum spektralen Verhalten
und zur enzymatischen Aktivität von
Rattenlebermikrosomen nach Behandlung
mit Nagarse**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Franz Niedermeier
aus Vilsbiburg

Mainz 1974



Fachbereichsdekan: Prof. Dr. P. Klein

Referent: Prof. Dr. G. F. Kahl

Korreferent: Prof. Dr. K. J. Netter

Termin der mündlichen Prüfung: 12. Juni 1974

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

EINLEITUNG

	Seite
1. Der mikrosomale Arzneimittelstoffwechsel	1
2. Die Wirkung von Metyrapon auf spektrale Eigenschaften und die enzymatische Aktivität von Lebermikrosomen	13
3. Ziel der Arbeit	17

METHODEN

1. Herstellung der Mikrosomenfraktion	18
a) Vorbehandlung mit Phenobarbital-Natrium	18
b) Aufbereitung der Lebermikrosomen	18
c) Eiweißbestimmung	19
2. Präparation von Nagarse-Partikeln	19
3. Messungen an Nagarse-Partikeln	21
3,1. Technik der spektralanalytischen Untersuchungen	21
3,2. Durchführung der Messungen	21
a) Hämoproteine	21
b) Elektronentransportkette	23
α) NADP-Reduktion	23
β) NADPH-Cytochrom c-Reduktase	23
γ) Neotetrazoliumdiaphorase	24
c) Ligandenbindung	25
d) Arzneimittelstoffwechsel	25
α) p-Nitroanisol-Demethylierung	25
β) Metyraponstoffwechsel	26
4. Chemikalien	28
5. Statistische Auswertung	28

ERGEBNISSE

1. Vergleichende Untersuchung über Eiweißgehalt, Gesamthämgehalt, Cytochrom b_5 - und Cytochrom P-450-Gehalt von PB stimulierten Mikrosomen vor und nach Behandlung mit Nagarse	29
---	----

1,1. Eiweißausbeute	29
1,2. Gesamthämgehalt	30
1,3. Cytochrom b_5 -Gehalt	31
1,4. Cytochrom P-450-Gehalt	32
2. Der Einfluß von Nagarse auf die weiteren Bestandteile der mikrosomalen Elektronentransportkette	34
2,1. NADPH-regenerierendes System	34
2,2. NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität und Neotetrazoliumdiaphorase-Aktivität	36
3. Substratbindung	37
3,1. Bindung von Typ I- und Typ II-Substraten an Nagarse-Partikeln	37
3,2. Bindung von Metyrapon und 3-Pyridyl-Propanol an reduzierte Nagarse-Partikeln	38
4. Arzneimittelstoffwechsel nach Inkubation mit Nagarse. Vergleichende Untersuchungen am oxidativen und reduktiven Stoffwechsel	40
4,1. pNA-Demethylierung	40
4,2. Metyraponstoffwechsel	42

DISKUSSION

1. Die mikrosomale Elektronentransportkette nach Nagarsedigestion	45
2. Spektrale Charakteristik von Pyridinderivaten mit Nagarse-Partikeln	50
3. Der Einfluß einer Proteinasebehandlung auf die Stoffwechselaktivität von Mikrosomen	52

ZUSAMMENFASSUNG

55

LITERATURVERZEICHNIS

57

E I N L E I T U N G

1. Der mikrosomale Arzneimittelstoffwechsel

Arzneimittel und andere Fremdstoffe, die in den menschlichen Körper gelangen, unterliegen dort meist einer für ihre Elimination notwendigen Umwandlung. Keineswegs immer ist der Metabolismus von Fremdsubstanzen ihrer Inaktivierung gleichbedeutend, wie am Beispiel der durch den Organismus gesteuerten Reduktion von Frontosil und Neoprontosil zu dem antibakteriell wirksamen Sulfonilamid deutlich wird. Prinzipiell laufen jedoch alle Reaktionsschritte, ob Umbau des Arzneimittelmoleküls oder Kopplung an körpereigene Trägersubstanz, in Richtung einer besseren Wasserlöslichkeit und damit einer größeren Ausscheidungsfähigkeit ab.

Für den Abbau der meist fettlöslichen Arzneimittel ist ein Enzymsystem verantwortlich, das in erster Linie im endoplasmatischen Retikulum der Leberparenchymzellen angetroffen wird.

Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen:

Ng = Nagarse

NgP = Nagarsepartikel

Vm = Vergleichsmikrosomen

NgÜ = Nagarseüberstand

VÜ = Vergleichsüberstand

MP = Metyrapon

PB = Phenobarbital

3-MC = 3-Methylcholanthren

EtNC = Äthylisocyanid

CO = Kohlenmonoxid

pNA = para-Nitroanisol

RES = retikuloendotheliales System

EDTA = Äthylendiamintetraacetat

RNA = Ribonukleinsäure

NADP, NADP⁺ = Nicotinamidadeninucleotidphosphat

NADPH = reduziertes NADP

NAD, NAD⁺ = Nicotinamidadeninucleotid

NADH = reduziertes NAD

Eine aus dem endoplasmatischen Retikulum durch Ultrazentrifugation gewonnene Präparation, die sogenannten Mikrosomen (CLAUDE, 1938; PALADE, 1956), wird seit den Arbeiten von BRODIE (1955), COOPER und BRODIE (1955), MITOMA und UDENFRIED (1955), zu Studien des hepatischen Arzneimittelstoffwechsels verwendet. Diese Zellfragmente sind neben der Hydrolyse und Reduktion hauptsächlich für die Oxydation von Fremdstoffen verantwortlich.

Schon Anfang der fünfziger Jahre berichteten STRITTMATTER und BALL (1952) über ein in den Mikrosomen befindliches Pigment vom Cytochrom b Typ, inzwischen Cytochrom b_5 (PAPPENHEIMER und WILLIAMS, 1954) benannt. Obwohl auf Grund der Untersuchungen an diesem Hämoprotein ein weiteres Cytochrom postuliert wurde (CHANCE und WILLIAMS, 1954), wurde dieses erst einige Jahre später als "CO-bindendes Pigment" (KLINGENBERG, 1958; GARFINKEL, 1958) beschrieben. Dieses wird vor allem dadurch charakterisiert, daß es in reduziertem Zustand mit Kohlenmonoxid einen Komplex bildet, der als breite Absorptionsbande mit einem Extinktionsmaximum bei 450 nm imponiert. Diese Eigenart, die auch die Benennung Cytochrom P-450 verständlich (OMURA und SATO, 1962) macht, erlaubt seine problemlose Messung (ESTABROOK et al., 1963) und macht die zentrale Bedeutung dieses Hämoproteins (KLINGENBERG, 1958; OMURA und SATO 1962) im Arzneimittelstoffwechsel offensichtlich.

Im Gegensatz zum Cytochrom b_5 , das relativ leicht solubilisiert werden kann (STRITTMATTER und VELICK, 1956; OMURA und SATO, 1963) und deshalb einer Untersuchung leichter zugänglich ist, findet man das Cytochrom P-450 in höheren Organismen fest an Membranen gebunden (YONG et al., 1970) vor. Seine Isolierung und Reinigung ist dadurch ziemlich erschwert, und bei den ersten Solubilisierungsversuchen wurde lediglich die enzymatisch inaktive Form, das Cytochrom P-420, gewonnen. Dieses wird

nach Behandlung mit bestimmten Enzymen, wie Phospholipase und Trypsin (OMURA und SATO, 1964 b; INAI und SATO, 1967 a), mit metallbindenden Substanzen oder Detergentien (MASON et al., 1965 a) leicht gebildet und geht in Lösung. Dabei steht die Fähigkeit zur Konversion, die diese Substanzen besitzen, mit ihrer Lipophilie und damit ihrer Interaktionsfähigkeit mit hydrophoben Gruppen des Moleküls in Zusammenhang (ICHIKAWA und YAMANO, 1967 b), während die Konformation des Proteins nicht unbedingt betroffen sein muß. Analog dazu besitzen Polyole, wie z.B. Glycerin, die Lipoproteine vor Denaturierung schützen (KELTZ und LOVELOCK, 1955), die Fähigkeit zur Rückkonvertierung (ICHIKAWA und YAMANO, 1967 b).

Solubilisiertes Cytochrom P-420 unterliegt bei pH-Werten, die niedriger als 7,5 sind, der Aggregation (OMURA und SATO, 1964 b), die sich elektronenmikroskopisch als Formation von langgestreckten, von Membranen umhüllten Tubuli darstellen läßt (SHOEMAN et al., 1969 b). ESR ("electron spin resonance")-Studien zeigen, daß je nach Behandlungsart der Spinzustand des Cytochroms unterschiedlich ist (MASON et al., 1965 a). Im Lichtabsorptionsspektrum weist sich das Konversionsprodukt als normales Hämoproteinspektrum vom b Typ (OMURA und SATO, 1964 b) aus. Gleichartige Untersuchungen über die molekularen Eigenschaften des Cytochrom P-450, die durch die starke Membranhafung und die Cytochrom b_5 Interferenz erschwert sind, zeigen dagegen ein völlig uncharakteristisches Verhalten für ein Hämoprotein. Nach verschiedenartiger Vorbehandlung aufgezeichnete Absolutspektren - neuerdings auch mit gereinigten Partikeln - zeigen zwar für das im oxidierten Zustand vorliegende Pigment eine Ähnlichkeit mit dem Cytochrom b Typ (s. auch Tabelle I), jedoch ist die reduzierte Form dafür ziemlich untypisch. Vermutlich ist die Reduktion von einer Änderung der Struktur um die Hämgruppe (SATO et al., 1969) begleitet. Die spektralen Veränderungen nach Reduktion lassen auch darauf schließen, daß sich der Spinzustand ändert. ESR-Studien zeigen, daß das im low spin-Status vorliegende oxidierte Cytochrom P-450

Tabelle I: Absolutspektren des Cytochrom P-450 in gereinigten bzw. teilgereinigten Cytochrom P-450 Partikeln.

Zustand des Cytochroms	Absorptionsbereich				Spezies	Autor
	delta	Soret	beta	alpha		
oxidiert	281	418	535	570	Pseudomonas putida	1.
	360	416	535	570	Kanin chen PB stimuliert	2.
	360	418	537	568	Ratten PB stimuliert	3.
	360	419	538	570	Ratten PB stimuliert	4.
reduziert		408	540			
		412	555			
		418	545			
		420	556			
reduziert und CO-begast	--	447	555			
	423	449	555			
	423	450	548			
	424	450	556			

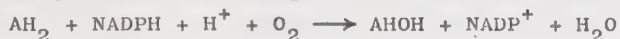
Autoren:

1. PETERSON, 1971
2. SATO et al., 1973
3. FUJITA et al., 1973
4. LU et al., 1973

(HASHIMOTO et al., 1962; MASON et al., 1965 a; ICHIKAWA und YAMANO, 1967 a) nach Reduktion in die high spin-Form übergegangen ist (MIYAKE et al., 1968). Alle diese Beobachtungen, zusammen mit dem im Gegensatz zu anderen Protohämehem mehr in den roten spektralen Bereich verschobenen Absorptionsmaximum des CO-Komplexes sowie einem eben-

falls "abnormen" Äthylisocyanidspektrum (OMURA und SATO, 1962; SATO et al., 1969; FUJITA et al., 1973), das in seiner unterschiedlichen Ausprägung mit den Absorptionsmaxima bei 430 und 455 nm stark vom pH und der Ionenstärke abhängig ist, nähren den Verdacht, daß Strukturunterschiede in der Gruppierung um das Häm oder innerhalb des Häms gegenüber anderen Protohämen vorhanden sind.

Die Schlüsselstellung des Cytochrom P-450 vor allem in dem oxidativen mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsel ist durch seine Funktion als Endoxidase - ähnlich dem Warburg'schen Atmungsferment in den Mitochondrien - bedingt. Im Unterschied zu dem Warburg'schen Atmungsferment kann dieses Enzym einerseits Sauerstoff aktivieren (ESTABROOK et al., 1963; OMURA et al., 1965), wobei es selbst am Hämeisen reduziert wird, andererseits ein Atom dieses aktivierten Sauerstoffes auf ein angebotenes Substratmolekül übertragen, während das andere Atom mit dem gleichzeitig benötigten Wasserstoff reagiert und Wasser bildet. Dieser Vorgang, der auch "mischfunktionelle Oxidation" oder "mixed function oxidation" (MASON, 1957) genannt wird, ist in der allgemeinen Gleichung



ausgedrückt. Wie hieraus schon ersichtlich wird, dient dabei als Wasserstoffdonator NADPH (AXELROD, 1955; GILLETTE et al., 1957), während der molekulare Sauerstoff der Atmosphäre entstammt (HAYASHI et al., 1956; POSNER et al., 1961). Die Kombination von verschiedenen Techniken, wobei die Sauerstoffutilisierung polarographisch erfaßt wird, die NADPH-Oxidation fluorometrisch gemessen und die Information über das entstandene Stoffwechselprodukt durch chemische Methoden erhalten wird, erlaubt die Bestätigung dieses Reaktionsschemas, wie es COOPER et al. (1962) bei der Steroidhydroxylierung zeigen konnten. Die Bindung von Kohlenmonoxid an das Cytochrom P-450 bewirkt eine Hemmung aller durch die Endoxidase katalysier-

ten Reaktionen. Dieser erstmals von RYAN und ENGEL (1957) für ein Steroids substrat und von CONNEY et al. (1957) für eine karzinogene Substanz beschriebene Hemmeffekt von CO, der durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 450 nm wieder aufgehoben werden kann, (COOPER et al., 1965 a), führte schließlich auch zum Nachweis der Funktion des Cytochroms als Endoxidase. Seine allgemeine Bedeutung für die oxidativen Stoffwechselprozesse wird nicht zuletzt dadurch deutlich, daß es neben zahlreichen inzwischen nachgewiesenen Oxidierungs- bzw. Hydroxylierungsreaktionen von Fremdstoffen auch den Abbau körpereigener Substanzen steuert; so z.B. die Hydroxylierung von Steroiden durch Lebermikrosomen und Mitochondrien der Nebennierenrinde (ESTABROOK et al., 1963), die Lipidperoxidation (ORRENIUS et al., 1964), sowie die ω -Oxidation von Fettsäuren (WADA et al., 1968; DAS et al., 1968), unter anderem auch in der Niere (ELLIN et al., 1973).

In seiner Funktion als zentrales Ferment bei der "mischfunktionellen Oxidation" ist das Cytochrom P-450 auch für die Substratbindung verantwortlich. Die Formierung eines Komplexes zwischen Substrat und des in oxidiertem Zustand vorliegenden Hämoprotein stellt dabei den ersten Schritt dar (REMMER, et al., 1966). Die Zugabe von oxidierbaren Substanzen zur Mikrosomensuspension äußert sich im Differenzspektrum in spektralen Veränderungen (NARASIMHULU et al., 1965; REMMER et al., 1966; IMAI und SATO, 1966), deren Ausmaß einerseits von der Menge des zugegebenen Liganden, andererseits von der Konzentration des Cytochrom P-450 abhängig sein soll (COOPER et al., 1965 b). Interessanterweise lassen sich dabei zwei in ihren spektralen Eigenschaften unterschiedliche Substanzgruppen feststellen, (REMMER et al., 1966; SCHENKMAN et al., 1967), je nach dem, ob sie das Spektrum mehr in den kurzwelligen oder in den langwelligen Bereich verschieben. Als Prototyp der sogenannten Typ-I Substrate, denen eine ganze Anzahl unterschiedlicher Substanzen zugeordnet wird, gilt Hexobarbital,

welches im Differenzspektrum bei 388 nm ein Absorptionsmaximum, bei 420-422 nm ein Absorptionsminimum hervorruft. Demgegenüber zeigen Typ-II Substrate wie Anilin, die durchweg aromatische, stickstoffhaltige Substanzen sind, ein etwa spiegelbildliches Verhalten mit einem spektralen Tal bei 390-405 nm und einem Gipfel bei 425-430 nm.

Diese auffallenden spektralen Differenzen zwischen den beiden Ligandengruppen mögen einmal ihre Erklärung in einer unterschiedlichen Bindungsart an das Cytochrom P-450 finden. So werden Eingriffe in die Proteinstruktur von Mikrosomen durch Behandlung mit Steapsin oder durch längerdauernde Lagerung im Kühlraum (SHOEMAN et al., 1969 a), aber auch die Extraktion von Phospholipiden durch Isooktan (LEIBMAN und ESTABROOK, 1971) mit einer teilweisen bzw. völligen Unfähigkeit der Mikrosomen zur Bildung von Typ-I Spektren beantwortet. Dieser Befund, sowie die Tatsache, daß Typ-I Substraten eine vergleichsweise höhere Lipophilie gemeinsam ist (SCHENKMAN et al., 1967 a; ULLRICH, 1969), läßt eine Interaktion von Typ-I Substrat und Lipoproteinanteil des Cytochroms (SCHENKMAN und SATO, 1968) vermuten. Dagegen scheinen Typ-II Substrate mit der CO- und damit auch der O₂-(ONURA et al., 1965; COOPER et al., 1965 a)-Bindungsstelle am Hämeisen zu interferieren. (SCHENKMAN, 1967 a). Dafür sprechen auch Untersuchungen über die Reduktionsgeschwindigkeit des CO-markierten Cytochroms - NADPH dient dabei als Co-faktor -, welche durch Typ-II Substrate im Sinne einer CO-Wirkung verlangsamt wird (GIGON et al., 1969) oder aber auch der Befund, daß nach Bindung von Typ-II Substraten an das Hämoprotein eine geringere Menge des mit dem reduzierten Cytochrom P-450 gebildeten CO-Komplexes gebildet wird (SASANE und GILLETTE, 1969). Im Gegensatz dazu wird durch Typ-I Substrate die Reduktionsgeschwindigkeit und die CO-Komplexbildung erhöht. Die NADPH-Oxidationsrate ist dabei ebenfalls erhöht, während sie durch Typ-II Substrate relativ unbeeinflusst bleibt (GILLETTE, 1969; GIGON et al., 1969).

Die beiden Ligandengruppen unterscheiden sich weiterhin deutlich in der Art ihrer gegenseitigen Beeinflussung. Während Typ-II Substanzen sowohl die Bindung an das Enzym (LEIBMAN et al., 1969) als auch den Umsatz von Typ-I Substraten kompetitiv hemmen (SASAME et GILLETTE, 1970), erhöhen letztere das Typ-II Bindungsvermögen (LEIBMAN et al., 1969).

Diese Vielzahl an Interaktionsmöglichkeiten von Substraten untereinander ist nur schwer allein durch den Vorgang der Substratbindung an das Cytochrom begründbar. Deshalb nehmen auch LEIBMAN und ESTABROOK (1971) an, nicht zuletzt auf Grund von vorangegangenen ESR-Studien von CAMMER et al. (1968), die einen nach Substratzugabe veränderten Elektronenstatus des oxidierten Cytochrom P-450 zeigen, sowie auf Grund von Untersuchungen von HILDEBRANDT et al. (1969) an phenobarbital- bzw. 3-methylcholanthrenstimulierten Mikrosomen, daß das Cytochrom in zwei interkonvertiblen Formen vorliegt, die das nach Substratzugabe erhaltene Spektrum je nach Ligandentyp unterschiedlich beeinflussen sollen.

Bei der Diskussion über die Grundlagen der unterschiedlichen Wechselwirkung der verschiedenen Substrate mit dem Enzym eröffnen sich jedoch noch andere Gesichtspunkte, wie aus der Möglichkeit einer gezielten Steigerung einer Bindungsart durch Enzyminduktion hervorgeht. Dieser Begriff bezeichnet den stimulierenden Effekt von zahlreichen Pharmaka, Insektiziden, Carcinogenen und anderen Fremdstoffen (CONNEY, 1967) auf die Enzymaktivitäten in den Mikrosomen, der nach mehrtägiger Vorbehandlung von Tieren zu sehen ist. Dabei sind nach ihrer unterschiedlichen stimulierenden Wirkung wieder zwei Typen induzierender Substanzen unterscheidbar, als deren Hauptvertreter einmal Phenobarbital (REMMER, 1959), zum anderen aber aus der Gruppe der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe (CONNEY et al., 1956; 1957) 3-Methylcholanthren gelten. Beide Typen bewirken gemeinsam eine auffällige Steigerung des Cytochrom P-450 Gehaltes (REMMER, 1969; KAMIN et al., 1965), sowie des NADPH-Cytochrom c-Reduktase Gehaltes (KAMIN

et al., 1965; ORRENIUS und ERNSTER, 1964; JICK und SHUSTER, 1966), während sie andere Bestandteile der mikrosomalen Elektronentransportkette wie Cytochrom b_5 und die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (ERNSTER und ORRENIUS, 1965; KAMIN und MASTERS, 1968) kaum oder gar nicht beeinflussen. Diese Steigerung ist sowohl auf eine gesteigerte Synthese als auch auf einen verlangsamten Abbau von Protein zurückzuführen. Die Ankurbelung der Eiweißsynthese ist durch Versuche mit Eiweißsyntheseblockern wie Äthionin (CONNEY et al., 1956; ALVARES et al., 1967), Puromycin (CONNEY und GILMAN, 1963; GELBOIN und BLACKBURN, 1964; ORRENIUS et al., 1965) und Actinomycin D (GELBOIN und BLACKBURN, 1964; CONNEY und GILMAN, 1963) oder durch den Einbau radioaktiv markierten Leucins in mikrosomales Eiweiß (JICK und SHUSTER, 1966) nachgewiesen worden. Andererseits findet man auch eine gesteigerte Hämsynthese, wie aus Versuchen mit ^{14}C -markiertem Häm (GREIM et al., 1970) oder mit einem Hemmstoff der Hämbiosynthese, Aminotriazol (3-Amino-1,2,4-triazol) hervorgeht (BARON und TEPHLY, 1969).

Unterschiedliches Verhalten zeigen die beiden Substanztypen jedoch im quantitativen Ausmaß des Stimulierungseffektes. So kann der Cytochrom P-450 Gehalt nach 3-tägiger PB-Induktion eine Steigerung um Faktor 6 erreichen, nach 3-MC Induktion jedoch nur um den Faktor 2,5 (REMMER, 1969). Das Abklingen des Induktionseffektes, bei PB-Stimulierung nach etwa 5 Tagen beendet, ist nach 3-MC Behandlung verlangsamt, vermutlich bedingt durch vermehrte Ablagerung in Fettdepots oder verzögerten Rückgang der gesteigerten Hämoproteinsynthese (SLADEK und MANNERING, 1969). Zum andern sieht man nach Vorbehandlung von Tieren mit 3-MC eine Erhöhung des Gesamtleberproteins (ARCOS et al., 1961; CONNEY, 1967), während PB spezifisch eine Vermehrung mikrosomalen Eiweißes (REMMER und MERKER, 1963) hervorruft.

Weiterhin erzielt man durch kombinierte Gabe von PB und 3,4-Benzpyren - ebenfalls ein polyzyklischer Kohlenwasser-

stoff - eine Potenzierung des Induktionseffektes, der durch einfache Dosissteigerung einer der beiden Substanzen nicht erreicht werden kann (GILLETTE, 1963; SLADEK und MANNERING, 1969). Als Resultat dieser unterschiedlichen Induktionswirkung erhält man eine größere Substratspezifität für 3-MC induzierte Mikrosomen, während PB eine breite Skala verschiedenartiger Reaktionen stimulieren kann.

Werden spektrale Parameter zur Untersuchung von Mikrosomen, die entweder PB- oder 3-MC- stimuliert sind, herangezogen, so findet man auch hier ein unterschiedliches Verhalten. So zeigt sich nach Vorbehandlung mit 3-MC sowohl im Differenzspektrum als auch im Absolutspektrum, das mit isolierten und gereinigten Cytochrom P-450 Partikeln aufgezeichnet wurde (FUJITA et al., 1973), eine Verschiebung des nach Dithionitreduktion und Begasung mit CO in Kontroll- und PB stimulierten Mikrosomen bei 450 nm auftretenden Absorptionsmaximums in den kurzwelligen Bereich: der Gipfel liegt dann bei 446 nm (HILDEBRANDT et al., 1969 a) oder bei 448 nm (ALVARES et al., 1967; FUJITA und MANNERING, 1971; GREENE et al., 1971). Diese Verschiebung ist nicht durch das Verbleiben des 3-MC in seiner Bindung an das Cytochrom bedingt, wie JEFEOATE und GAYLOR (1969) und FUJITA et al. (1973) mit Hilfe von radioaktiv markiertem 3-MC nachweisen können. Auch die ESR-Spektren zeigen einerseits eine Zuordnung von PB-stimulierten Mikrosomen zu der low spin-Form, andererseits von 3-MC-stimulierten Mikrosomen zu der high spin-Form (HILDEBRANDT et al., 1969 a; PEISACH und BLUMBERG, 1970). In teilweise gereinigten, solubilisierten Cytochrom P-450 Partikeln (LU et al., 1973) scheinen jedoch beide Formen sowohl nach PB-, als auch nach 3-MC Vorbehandlung nebeneinander zu existieren, wenn auch zu unterschiedlichen Anteilen (STERN et al., 1973).

Aufschlußreich ist nun, daß die unterschiedliche Vorbehandlung auch ein unterschiedliches Substratbindungs-

verhalten bewirkt. So ist nach PB-Induktion das durch die Bindung von Typ-I Substraten an das Cytochrom P-450 hervorgerufene Spektrum vergrößert, nach 3,4-Benzpyren oder 3-MC Vorbehandlung dagegen verkleinert, während beide Induktortypen positiv auf das Typ-II Spektrum wirken (REMMER et al., 1966; SHOEMAN et al., 1969 a; SCHENKMAN et al., 1969). Vergleichbar damit sind auch Befunde von MANNERING (1971 a), nach denen das nach 3-MC Induktion erhaltene Cytochrom "P₁-450" nicht mehr zur Bindung von Typ-I Substraten befähigt sein soll. Diese Befunde, die aus den Untersuchungen über den unterschiedlichen Effekt der beiden Induktorentypen hervorgehen, veranlassen BIDDLEMAN und MANNERING (1970) zur Postulierung zweier unabhängig voneinander vorliegender Cytochrome, die entweder nach PB- oder nach 3-MC Stimulierung gebildet werden. Demgegenüber steht die bereits vorhin erwähnte Auffassung, das Cytochrom P-450 liege in zwei interkonvertiblen Formen vor (LEIBMAN und ESTABROOK, 1971), wobei auch die nach Induktion gewonnenen Ergebnisse in diesem Sinne gewerten werden.

Das Problem der enzymatischen Reduktion des Cytochrom P-450 erfährt eine unterschiedliche Interpretation. Während Cytochrom P-450 als Endoxidase die Substratbindung und die O₂-Aktivierung übernimmt, wird der von NADPH als Co-faktor zur Verfügung gestellte Wasserstoff über eine Elektronentransportkette - ähnlich der mitochondrialen Atmungskette - herbeigeschafft. Die Beteiligung eines Flavoproteins, der NADPH-Cytochrom c-Reduktase, das bereits gereinigt und isoliert werden konnte (WILLIAMS und KAMIN, 1962; PHILLIPS und LANGDON, 1962), ist inzwischen bestätigt (ORRENIUS und ERNSTER, 1964; OMURA, 1969). Als Elektronenbrücke zwischen diesem Flavoprotein und der Endoxidase wird noch ein bisher unbekannter Faktor "X" gefordert (ESTABROOK et al., 1969; DALLNER et al., 1966), der ein nicht an Häm gebundenes Eisen enthält und dem aus der Nebennierenrinde isolierten "non-heme-iron (NHI)-protein" (OMURA et al., 1965) entspricht.

Auch dem zweiten in den Mikrosomen befindlichen Hämoprotein, dem Cytochrom b_5 , ist als Elektronendonator ein Flavoprotein, die von STRITTMATTER (1958) isolierte NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, vorgeschaltet, die aber auch von NADPH Elektronen aufnehmen kann (COHEN und ESTABROOK, 1971 a). Welche Bedeutung ein an dabei dem Hämoprotein nachgeschalteten "cyanid sensitive factor" unter anderem auch für die mischfunktionelle Oxidation zukommt (OSHINO et al., 1966; GAYLOR et al., 1970), bedarf der weiteren Aufklärung. Gesichert scheint dessen Beteiligung jedoch bei der von Mikrosomen katalysierten Fettsäuredesaturierung (OSHINO et al., 1971).

Die Überprüfung des Reaktionsablaufes der von Cytochrom P-450 katalysierten mischfunktionellen Oxidierung ergibt, daß dabei ein zwei Elektronen transportierendes System benötigt wird (ESTABROOK et al., 1969). Untersuchungen von ULLRICH et al. (1968), WATERMAN und MASON (1970) und PETERSON (1971) ergeben jedoch, daß Cytochrom P-450 nur als 1-Elektron-Akzeptor fungieren kann. Diese verwirrende Tatsache findet ihre Antwort nun in verschiedenen Hypothesen über die Herkunft des zweiten Elektrons, die sämtlich noch auf ihre Bestätigung warten. So gelangen COOPER et al. (1965 b) auf Grund ihrer Studien zu der Ansicht, daß Sulfhydrylgruppen als Akzeptoren des zweiten Elektrons dienen können, da sie mit dem Cytochrom P-450 in enger Beziehung zu stehen scheinen. Eine andere Hypothese spricht sich für die Beteiligung von Cytochrom b_5 an der mischfunktionellen Oxidierung aus (ESTABROOK et al., 1969), wobei ein zweites Elektron über die Reaktionskette NADH - NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase - Cytochrom b_5 zu dem bereits im oxygenierten Zustand vorliegenden Cytochrom P-450 gelangt und somit die Hydroxylierung des Substrates sowie die Bildung von Wasser ermöglicht ist (HILDEBRANDT und ESTABROOK, 1971).

2. Die Wirkung von Metyrapon auf spektrale Eigenschaften und die enzymatische Aktivität von Lebermikrosomen.

In den letzten Jahren ist zu Untersuchungen des Arzneimittelstoffwechsels in vitro und der Ligandenbindung an reduziertes Cytochrom P-450 häufig das Pyridinderivat Metyrapon (MP) herangezogen worden. Metyrapon (2-Methyl-1, 2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon), zunächst als Hemmstoff der adrenalen 11- β -Steroid-Hydroxylase bekannt geworden (LIDDLE et al., 1958; CHART und SHEPPARD, 1959), erfährt schon seit geraumer Zeit im sogenannten Metopirontest zur Erfassung der Rückkoppelung zwischen Nebennierenrinde und Hypophysenvorderlappen klinische Anwendung. Von allgemeiner pharmakologischer Bedeutung wird diese Substanz jedoch durch ihren Einfluß auf die Funktion der Endoxidase bei der mischfunktionellen Oxidation in den Lebermikrosomen.

Eine Hemmung des oxidativen Stoffwechsels durch Metyrapon, von NETTER et al. (1967) erstmals bei der O-Demethylierung von p-Nitroanisol, der N-Demethylierung von Amidopyrin, sowie der Ringhydroxylierung von Acetanilid beschrieben, finden auch LEIBMAN (1969) für den Abbau von Hexobarbital und Amidopyrin oder UEHLEKE (1971) et al. für die N-Hydroxylierung von 4-Chloranilin und 2-Naphtylamin sowie für die N-Demethylierung von N-Methylanilin und Perazin. Nach LEIBMAN (1969) hemmt jedoch MP nur den Abbau von Typ-I Substraten in jedem Falle, während der Umsatz von Typ-II Substraten von MP konzentrationsabhängig unterschiedlich beeinflußt wird. So hemmen zwar höhere Konzentrationen von MP (10^{-2} M) die Hydroxylierung von Acetanilid (LEIBMAN, 1969; NETTER et al., 1967), kleine Konzentrationen von MP wirken aber stimulierend auf die Umsatzrate, vergleichbar der Wirkung von EtNC auf die Anilinhydroxylierung (INAI und SATO, 1968). Eine befriedigende Erklärung dieses konzentrationsabhängig- unterschiedlichen Effekts von MP, der für Aceta-

nilid auch durch Untersuchungen an der isolierten Leber im "semi-in-vivo-System" bestätigt ist (MINCK et al., 1972), steht noch aus. Während nach Untersuchungen von KAHL und SIMON (1971) MP in der mitochondrialen Atemkette die Oxidation der Pyridinnucleotide beeinflusst, ist der Ansatzpunkt der Wirkung von MP auf den mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsel anderswo zu suchen. Die NADPH-Oxidation bleibt durch Metyrapon unbeeinflusst (NETTER et al., 1967), desgleichen ist der polarographisch erfaßte Sauerstoffverbrauch durch Mikrosomen in Abwesenheit eines hydroxylierbaren Substrates nach MP-Zugabe unverändert (KAHL und NETTER, 1970). Auf der anderen Seite soll die Oxidation reduzierten Cytochroms P-450 durch MP vermindert sein (HILDEBRANDT et al., 1969 b), was eine direkte Hemmung der mischfunktionellen Oxidation vermuten läßt. Andererseits spricht die Eigenschaft von MP - entsprechend allen Typ-II Substraten-, die Reduktion von Cytochrom P-450 zu hemmen, sowie Befunde, die eine kompetitive Hemmung des Stoffwechsels verschiedener Substrate durch MP zeigen (DOMINGUEZ und SAMUELS, 1963; WILSON et al., 1969; NETTER et al., 1969; PETERSON et al., 1971), für einen Effekt, der als Behinderung der Sauerstoffbindung an das Cytochrom oder als Konkurrenz mit dem Substrat um die Bindungsstelle vorstellbar wäre.

Ein eigener oxidativer Stoffwechsel des MP, der eine solche Konkurrenz auf der Ebene der Substratbindung verständlich machen würde, war bis vor kurzem nicht bekannt. Neuere Befunde zeigen jedoch, daß MP von Lebermikrosomen vermutlich über zwei verschiedene Stoffwechselwege, einen reduktiven und einen oxidativen, abgebaut wird. Als Hauptmetabolit ist das an der aliphatischen Ketogruppe zum sekundären Alkohol reduzierte MP, bekannt als Metyrapol, (SPRUNT et al., 1967; KRAULIS und BIRMINGHAM, 1963) beschrieben, das über eine mikrosomale Reduktase mit NADPH als Cofaktor entsteht (KAHL, 1970 a). Dieser reduzierte Metabolit zeigt, allerdings in geringerem Maße, eine ähn-

liche Wirkung auf den Fremdstoffwechsel (NETTER et al., 1969) wie sein oxidiertes Ausgangsprodukt und ist darin, sowie in seinen spektralen Eigenschaften, anderen Pyridinderivaten gut vergleichbar (JONEN et al., 1974); im Gegensatz zu anderen Pyridinderivaten übt er, ebenso wie MP selbst, in geeigneten Konzentrationen eine aktivierende Wirkung auf den Arzneimittelumsatz in vitro aus (KAHL et al., 1973).

Neben diesem reduktiven Metaboliten können zwei weitere, in Lebermikrosomen entstehende Stoffwechselprodukte des MP gefunden werden, die offensichtlich über das Cytochrom P-450 durch eine mischfunktionelle Oxidierung entstehen (TÜTTENBERG, Dissertation 1974). Sie erscheinen im Gegensatz zum reduzierten Metyrapon nur bei reichlichem Sauerstoffangebot. Durch Induktion mit PB wird der oxidative Metabolismus um ein vielfaches gesteigert, während die Reduktionsrate nur gering oder gar nicht erhöht wird. Als Cofaktor dieses Stoffwechselweges von MP wird ebenfalls NADPH gefunden. Nach diesen Befunden ist eine Konkurrenz des MP mit anderen Substraten durchaus vorstellbar.

Aufgrund der verschiedenartigen widersprüchlichen Befunde, die bei der Untersuchung der Metyraponwirkung erhalten werden, postuliert NETTER et al. (1969) zwei Bindungsstellen für MP am Cytochrom P-450, eine, die der Bindungsstelle von CO und O₂ am Hämeisen entspricht, eine andere an der Stelle der Substratbindung.

Neue Ergebnisse, die eine nicht kompetitive Hemmung der N-Demethylierung von Aminopyrin und Äthylmorphin bei niedrigen MP-Konzentrationen ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$), eine kompetitive Hemmung dagegen bei höheren Konzentrationen ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) schildern ROOTS und HILDEBRANDT (1973), könnten im Sinne dieses Modells gedeutet werden.

Auch die spektralen Veränderungen, die durch MP in Lebermikrosomen hervorgerufen werden, weisen einige Besonderheiten auf und bedürfen in manchen Punkten noch einer Klärung. Im Differenzspektrum bildet Metyrapon in oxi-

dierten Mikrosomen ein Typ-II Spektrum aus. Daneben ruft MP auch ein Bindungsspektrum in dithionitreduzierten Mikrosomen hervor, dessen Absorptionsmaximum in der Soretregion- ähnlich dem CO-Spektrum -bei 446 nm (HILDEBRANDT et al., 1969 b) erscheint, während im sichtbaren Bereich vier Absorptionsgipfel bei 527, 539, 557 und 567 nm beobachtet werden. Die Fähigkeit zur Bildung langwelliger Soretbanden mit reduziertem Cytochrom P-450 wird auch für Äthylisocyanid (ONURA und SATO, 1964 a), Pyridin (IMAI und SATO, 1967 b), Anilin (IMAI und SATO, 1967 b; JEFEOATE et al., 1969), reduziertes Metyrapon und andere Pyridinderivate (KAHL und KAHL, 1971) beschrieben. Während jedoch bei der Bindung von Äthylisocyanid (EtNC), Anilin, aber auch von Pyridin und den meisten Pyridinderivaten (JONEN, 1973) eine zweigipflige Soretbande beobachtet wird, tritt mit MP als Substrat ein zweiter bei 425 nm lokalisierter Gipfel nur vorübergehend auf (JONEN et al., 1974). Nach Reduktion von Cytochrom P-450 mit NADPH zeigt auch Piperonylbutoxid - im Gegensatz zu den hier genannten Liganden des reduzierten Cytochrom P-450 ein Typ-I Substrat - einen doppelgipfligen Soretpeak (PHILPOT und HODGSON, 1971).

Eine pH-Abhängigkeit für die unterschiedliche Ausprägung der beiden Gipfel, wie sie für das EtNC-Spektrum gilt (IMAI und SATO, 1967 b), ist auch für die Pyridinderivate nachgewiesen (JONEN et al., 1974). Das unterschiedliche Verhältnis der beiden Soretbanden, welches das EtNC-Spektrum nach Induktion mit PB bzw. 3-MC zeigt (ALVARES et al., 1967; SLADEK und MANNERING, 1966 a), wird auch für Metyrapon als Liganden beobachtet (KAHL und KAHL, 1971). Die Doppelgipfligkeit der Soretregion, das auf die Anwesenheit zweier Hämoproteine hinweist, wird in dem Sinne gedeutet, daß der Ligand mit zwei verschiedenen Formen des reduzierten Cytochrom P-450 zwei verschiedene Komplexe eingeht, die interkonvertibel sind.

3. Ziel der Arbeit

Ausgehend von der Arbeit von SATO et al. (1969) soll durch vorsichtiges Behandeln von PB stimulierten Mikrosomen mit der unspezifischen Proteinase Nagarse Cytochrom b_5 solubilisiert werden und damit die beiden in den Mikrosomen befindlichen Hämoproteine Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 getrennt einer weiteren Untersuchung zugänglich gemacht werden.

Zunächst wird der Solubilisierungseffekt untersucht und darüber eine Bilanz erstellt. Der Einfluß von Nagarse auf Bestandteile der mikrosomalen Elektronentransportkette wird gezeigt und eine mögliche Behinderung der NADP-Reduktion im NADPH regenerierenden System geprüft.

Es schließen sich Untersuchungen an, die die Bindungscharakteristik von Pyridinderivaten, in diesem Falle Metyrapon und 3-(3-Pyridyl)-Propanol, in deduziert gehaltenen Mikrosomen nach Behandlung mit Nagarse mit dem Verhalten dieser Liganden in Mikrosomen, denen keine Proteinase zugesetzt wurde, vergleichen. Die Frage einer möglichen Rolle von Cytochrom b_5 bei der Bindung von Pyridinderivaten soll auch anhand von solubilisiertem Cytochrom b_5 geklärt werden.

Die Mikrosomen, die einer Behandlung durch Nagarse unterworfen waren, sollen hinsichtlich ihrer stoffwechselwirksamen Aktivität geprüft werden. Als Modellreaktion dient bei diesen Versuchen der Metyraponmetabolismus, der in Lebermikrosomen sowohl einen reduktiven als auch einen oxidativen Abbauweg beschreitet, sowie die O-Demethylierung von p-Nitroanisol. Der Nagarseeinfluß auf diese Reaktionen wird gezeigt und ein Vergleich zu Mikrosomen gezogen, die nicht mit Nagarse behandelt wurden.

M E T H O D E N

1. Herstellung der Mikrosomenfraktion:

a) Vorbehandlung mit Phenobarbital-Natrium

Männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 150-170 g erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine intraperitoneale Injektion von 80 mg Phenobarbital-Natrium/kg Körpergewicht in einem Volumen von 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung. Zur Nahrung diente Altromin^R-Trockenfutter (Fa. Altromin, Lage/Lippe), das 12 Stunden vor dem Töten entzogen wurde. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

b) Aufbereitung der Lebermikrosomen

Nach Töten der Ratten durch Überstreckung der Halswirbelsäule und anschließendem Ausbluten durch Eröffnen der Halsgefäße wurde der Bauchsitus freigelegt. Das Darmkonvolut wurde nach rechts geklappt, die nun dargestellte Pfortader wurde katheterisiert. Danach wurden die Lebern, nachdem die Vena cava durchschnitten war, mit eiskalter 0,9% NaCl Lösung perfundiert, um die Erythrozyten herauszuwaschen. Durch zusätzliche Massage erschien die Leber nach 2-3 Minuten als entfärbt. Darauf wurden die Lebern aus der Bauchhöhle entfernt und auf das Dreifache ihres Gewichtes mit einer 0,25 molaren Saccharoselösung, die 0,005 M Versen = Na⁺-EDTA und 0,02 M Trishydroxymethylaminomethan enthält und mittels 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt wird (SVT-Lösung) (LEYBOLD und STAUDINGER, 1959), aufgewogen. Im Kühlraum bei einer Temperatur von maximal 4°C wurden sie homogenisiert, anschließend 15 min. lang bei 1600 x g und zusätzlich 30 min. bei 9000 x g in einer Sorvall Zentrifuge, Modell RC2-B, zentrifugiert, um Zelldetritus und Mitochondrien zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgehoben und 60 min. lang in einer

Beckman-Ultrazentrifuge vom Typ L 2 65 B bei 105 000 x g zentrifugiert. Bei allen Zentrifugationsgängen betrug die Temperatur, automatisch regulierbar, 4°C. Das Sediment, das die Mikrosomenfraktion enthielt, wurde noch zweimal gewaschen, indem es mit SVT-Lösung resuspendiert, nochmals bei 105 000 x g zentrifugiert und das Resediment schließlich wieder in SVT suspendiert wurde. Nachfolgend wurden die Mikrosomen in 1-2 ml-Portionen bei -20°C eingefroren.

c) Eiweißbestimmung

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach einer von LOWRY et al. (1951) angegebenen Methode. Als Standard diente dabei Lab-Trol^R (Dade Reagents Inc., USA).

2. Präparation von Nagarse-Partikeln:

Die Behandlung von Lebermikrosomen mit Nagarse, einer unspezifischen Proteinase, wurde nach einer von SATO et al. (1969) beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden zwei Ansätze hergestellt, ein Probe- und ein Vergleichsansatz. Aus dem Probeansatz wurden die Nagarse-Partikel und der Nagarse-Überstand, aus dem Vergleichsansatz die Vergleichsmikrosomen und der Vergleichsüberstand gewonnen. Es wurden jeweils nur Mikrosomen phenobarbitalstimulierter Ratten verwendet. Für jede Präparation wurde eine eigene Charge von Ausgangsmikrosomen eingesetzt. Jeweils 100 mg mikrosomalen Proteins wurden in 20 ml einer Lösung, die aus 0,065 M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,0) und 30 Vol.% Glycerin bestand, suspendiert. Die Mitinkubation von Glycerin erfolgte zur Stabilisierung von Cytochrom P-450 und zum Schutz vor Konversion zu Cytochrom P-420 (ICHIKAWA und YAMANO, 1967 b). Durch eine Inkubation in Stickstoffatmosphäre sollten die mikrosomalen Bestandteile vor Lipidperoxidation geschützt und die Entstehung endogenen Kohlenmonoxids verhindert werden. Dazu wurden

beide Ansätze in 100 ml-Erlenmeyer-Kolben gebracht, die eine für die Begasung günstige breite Bodenfläche besitzen. Als Verschuß dienten zwei Gummistopfen, die jeweils zwei mit Glasröhren versehene Öffnungen für den Durchstrom des Gases besaßen. Der Stickstoff war vorher zur vollständigen Reinigung von Sauerstoff durch eine Fritte geleitet worden, in der sich eine deoxygenierende Lösung, bestehend aus 0,05% Anthrachinonsulfonsäure-(2)-Natriumsalz in 0,1 N NaOH, mit 0,5% Natriumdithionit reduziert (GIGON et al., 1969), befand. Schließlich wurden die Ansätze noch in einen mit Deckel verschließbaren Eistopf gesetzt, in dem das Eis nur langsam taute und in dem deshalb über lange Zeit eine Temperatur um 0°C gewährleistet war. Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden wurden die Ansätze in Zentrifugenröhrchen gegeben und bis auf das Fassungsvermögen der Röhrchen mit Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,0) aufgefüllt. Nach einer 60-minütigen Zentrifugation bei 105 000 x g wurde der gewonnene Überstand abgeschüttet und ebenso wie das Sediment, das in Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,0) rehomogenisiert wurde, aufbewahrt. War durch die nachfolgende Eiweißbestimmung der Proteingehalt der Nagarse-Partikeln, des Nagarse-Überstandes und der Vergleichsmikrosomen bekannt, wurden die Nagarse-Partikeln und die Vergleichsmikrosomen gleichzeitig mit den Ausgangsmikrosomen wieder aufgetaut, in Portionen zu 2,5 mg bzw. 5 mg aufgeteilt und wieder eingefroren. Dadurch sollte eine möglichst standardisierte Alterung aller Ansätze gewährleistet werden. Vom Nagarse-Überstand, in dem die Eiweißkonzentration gering war, wurden 1,25 - bzw. 2,5 - mg-Portionen eingefroren. Der Überstand der Vergleichsmikrosomen enthielt kein nachweisbares Eiweiß; von ihm wurden generell 2 ml-Portionen eingefroren.

3. Messungen an Nagarse-Partikeln:

3.1. Technik der spektralanalytischen Untersuchungen

Die Messungen an den Nagarse-Partikeln wie auch an den Vergleichsmikrosomen, den Ausgangsmikrosomen sowie den Überständen, erfolgte größtenteils am Doppelwellenlängenphotometer Aminco-Chance, wobei je nach Versuchsanordnung die beiden möglichen Verfahrensweisen an diesem Gerät angewendet wurden: einmal das Spaltstrahlverfahren (Split-beam mode) zur Erfassung von Differenzspektren, zum anderen das Doppelwellenlängenverfahren (Dual-wavelength-mode), bei dem Absorptionsveränderungen als Funktion der Zeit gemessen werden können. Bei der ersten Methode fallen Lichtstrahlen gleicher Wellenlänge über einen wählbaren Wellenlängenbereich nahezu gleichzeitig in einen identisch behandelten Doppelansatz. Nach Abgleichen von Extinktionsunterschieden zwischen Probe und Vergleichsküvette wird die Null-Linie geschrieben, daraufhin die zu prüfende Substanz eingegeben und die entstandenen Absorptionsunterschiede aufgetragen. Beim Doppelwellenlängenverfahren dagegen treffen Lichtstrahlen zweier unterschiedlicher Wellenlängen, die vorher auf Grund der Absorptionseigenschaften der untersuchten Substanz (meist Absorptionsmaximum und isosbestischer Punkt) gewählt wurden, in rascher Folge auf eine Küvette. Nach Start der Reaktion wird die Änderung des Extinktionsunterschiedes zwischen den beiden Wellenlängen im Verhältnis zur beanspruchten Zeit aufgezeichnet. Für die Ansätze wurden immer Küvetten von 1 cm Lichtweg benutzt, die Temperatur betrug dabei konstant 30°C.

3.2. Durchführung der Messungen

a) Hämoproteine

Zur Bestimmung des Gesamthämgehaltes nach der Methode von OMURA und SATO (1964 a) wurden die verschiedenen mikrosomalen Präparationen in einer

Konzentration von 1 mg Eiweiß/ml, der Nagarse-Überstand in einer Konzentration von 1/2 mg Eiweiß/ml und der Vergleichsüberstand in einem Volumen von 2 ml ad 5 ml 0,15 N NaOH, die 20 Vol. % Pyridin enthielt, zugegeben. Der so beschickte Ansatz wurde in zwei Küvetten verteilt und die Meßküvette mit Natriumdithionit reduziert, wodurch ein Pyridinhämochromogenspektrum erhalten wurde. Die Extinktionsdifferenz, die bei diesem Spektrum zwischen den Wellenlängen 557 und 572 nm gemessen wurde, diente zur Berechnung des Gesamthämgehaltes. Als molarer Extinktionskoeffizient wurde $32,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ benutzt. (ONURA und SATO, 1964 a).

Für die Bestimmung von Cytochrom P-450 wurden 5 mg Protein in 5 ml Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) suspendiert, der gesamte Ansatz mit 1 mg/ml Natriumdithionit reduziert und in Probe- und Referenzküvette verteilt. Nach Erstellen der "base-line" wurde die Probeküvette 1 Min. lang mit CO durchperlt. Das entstandene Absorptionsmaximum bei 450 nm gegenüber 500 nm wurde der Berechnung des Cytochrom P-450 Gehaltes zugrunde gelegt, als Extinktionskoeffizient wurde $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ benutzt (ONURA und SATO, 1964 a).

Ein dithionitreduzierter Doppelansatz wurde auch für die Erfassung des konvertierten Cytochroms P-420 im Differenzspektrum verwendet. Kohlenmonoxid wurde jedoch vor der Reduktion durch die Probeküvette geschickt. Hier diente die Extinktionsdifferenz zwischen den Wellenlängen 420 nm und 500 nm als Maßstab für den Cytochrom P-420 Gehalt. Zur Messung des von vornherein an endogenes CO gebundenen Anteils von Cytochrom P-450 wurde der Absorptionsunterschied bei 450 nm zwischen einem dithionitreduzierten und einem nichtreduzierten Ansatz geprüft. Dieser Absorptionsunterschied entspricht vor Zufuhr exogenen CO's dem Cytochrom

P-450 Komplex mit endogenem CO. Nach Begasung des reduzierten Ansatzes mit exogenem CO stellt sich der totale Cytochrom P-450-Gehalt dar.

Der Cytochrom b_5 -Gehalt wurde im Differenzspektrum aus der Extinktionsdifferenz zwischen den Wellenlängen 424 nm und 500 nm nach Reduktion des Probeansatzes mit NADH errechnet, wobei ein molarer Extinktionskoeffizient von $112 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet wurde (SCHENKMAN et al., 1973).

b) Elektronentransportkette

α) NADP-Reduktion

Um auszuschließen, daß die Nagarse den Reaktionsablauf bei den einzelnen Versuchsanordnungen durch einen Angriffspunkt bei der NADP-Reduktion stört, wurde die Reduktionsgeschwindigkeit fluorometrisch einmal in Puffer mit und ohne Nagarse, zum andern in PB-Mikrosomen, in PB-Mikrosomen, denen $150 \mu\text{g}$ Nagarse pro mg Protein zugesetzt worden war, und in Nagarse-Partikeln gemessen. Sowohl für die Messung der NADP-Reduktion in der Pufferlösung als auch in den behandelten und unbehandelten Mikrosomen wurde Sörensen-Phosphat-Puffer ($0,065 \text{ M}$; pH 7,4) verwendet. Ein NADPH-regenerierendes System, bestehend aus $1,5 \mu\text{Mol}$ G6P, $1,2 \mu\text{Mol}$ NADP und $1,2$ Einheiten G6PDH befand sich in der Lösung. Die Reaktion wurde mit NADP gestartet.

β) NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Zur Messung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase diente die von MASTERS et al. (1965) angegebene Methode. In einem Ansatz von $2,5 \text{ ml}$ Endvolumen befanden sich $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ EDTA, 36 nMol Cytochrom c, $0,025 \text{ mg}$ mikrosomales Protein und $0,065 \text{ M}$ Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,7). Der Ansatz verblieb 5 Min. zur Äquilibration bei 30°C im Küvettenständer, dann

wurde mit 10 μ l einer 1×10^{-3} M NADPH-Lösung, die frisch angesetzt war, gestartet. Gemessen wurde die Reaktion im Doppelwellenlängenverfahren bei dem Wellenlängenpaar 550 und 620 nm. 620 nm war in einem Kontrollversuch, bei dem das Spektrum des reduzierten und des oxidierten Cytochrom c verglichen worden waren, als isosbestischer Punkt festgestellt worden. Die Reaktion verlief etwa 3 Min. linear. Als molarer Extinktionskoeffizient für die Auswertung des Umsatzes von Cytochrom c diente $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (MASTERS et al., 1965). Zur Prüfung der Aktivität in den Überständen wurde vom Nagarse-Überstand ein 0,025 mg Protein entsprechendes Volumen eingesetzt. Ein gleiches Volumen sollte beim Vergleichsüberstand Aufschluß über die Reaktionsgeschwindigkeit geben.

8) Neotetrazoliumdiaphorase

Die Messung der NADPH-abhängigen Neotetrazoliumdiaphorase ist bei WILLIAMS und KAMIN (1962) beschrieben. 0,15 μ Mol Neotetrazolium wurden zusammen mit einem NADPH-regenerierenden System in der oben erwähnten Zusammensetzung sowie 0,065 M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,6) in einem Endvolumen von 2,5 ml 5 Min. lang bei 37°C präinkubiert und wieder in Eis zurückgestellt. Nach Starten der Reaktion mit 0,04 mg/ml mikrosomalen Proteins, bzw. der entsprechenden Proteinmenge vom Nagarse-Überstand oder eines gleichen Volumens vom Vergleichsüberstand wurden die Ansätze weitere 10 Min. bei 37°C inkubiert und schließlich die Reaktion mit 2,9 ml einer "Triton X-Mixtur", bestehend aus 40 ml aqua bidest mit 10% Triton X 100, 40% Formaldehyd und 1 M Formiat-Puffer (pH 3,5), gestoppt. Als Leerwert diente ein Ansatz, der sofort nach Start der Reaktion mit der "Triton X-Mixtur" gestoppt wurde. Anschließend wurde die Extinktion des ent-

standenen Formazans in einem Eppendorf-Photometer mit einem Filter der Wellenlänge 492 nm gemessen. Der Auswertung lag ein molarer Extinktionskoeffizient von $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zugrunde (HERNANDEZ et al., 1967).

c) Ligandenbindung

Um die Bindung der Pyridinderivate MP und 3-(3-Pyridyl)-Propanol an dithionitreduziertes Cytochrom P-450, die ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 446 nm hervorruft, in Mikrosomen und Nagarse-Partikeln zu vergleichen, wurden Differenzspektren bei dem pH-Optimum von 7,8 (JONEN, 1974) gemessen. Als Puffer diente wieder 0,065 M Sörensen-Phosphat-Puffer. MP wurde in einer Endkonzentration von $1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$, 3-(3-Pyridyl)-Propanol in einer Endkonzentration von $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ zugegeben. Daneben wurden die oxidativen Bindungsspektren von MP als Typ II-Substrat und Hexobarbital als Typ I-Substrat bei behandelten und unbehandelten Mikrosomen verglichen. In einer Mikrosomensuspension von 1 mg/ml in Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) wurde nach Erstellen der "base line" entweder $1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ MP (Endkonzentration) oder $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ Hexobarbital (Endkonzentration) zugegeben und das entstandene Differenzspektrum aufgezeichnet.

d) Arzneimittelstoffwechsel

α) p-Nitroanisol-Demethylierung

Zur Untersuchung des oxidativen Stoffwechsels diente die pNA-Demethylierung. Hierbei wurde die Entstehung von p-Nitrophenol im Doppelwellenlängenverfahren bei den Wellenlängenpaaren 405 und 485 nm (Methode nach NETTER, 1960; verändert nach LIER, 1972) gemessen. Im Ansatz befanden sich 0,065 M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,85), NADPH-regene-

rierendes System wie bei der Beschreibung der Messung der NADP-Reduktion angegeben, 1 mg/ml mikrosomales Protein und pNA in einer Endkonzentration von 2×10^{-4} M. Der nicht reduzierte Ansatz verblieb 5 Min. zur Äquilibration bei 30°C im Küvettenständer, dann wurde mit NADP gestartet. Die Bildung von p-Nitrophenol wurde 2 Min. lang registriert. Aus der Anfangssteigung wurde durch Anlegen einer Tangente der Umsatz von pNA pro Min. und mg Protein unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (MINCK et al., 1973) errechnet.

B) Metirapon-Stoffwechsel

Der Abbau von MP durch die Lebermikrosomen erfolgt über einen reduktiven und einen oxidativen Weg. Die verschiedenen Metaboliten werden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt. Unbehandelte Mikrosomen sowie Vergleichsmikrosomen und Nagarse-Partikeln wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml zu einem Ansatz gegeben, der ein NADPH-regenerierendes System, 0,065 M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) und MP in einer Endkonzentration von $1,0 \times 10^{-3}$ M enthielt. Vom Nagarse-Überstand wurden ebenfalls 1 mg/ml, vom Vergleichsüberstand 2 ml eingesetzt und jeweils auf ein Endvolumen von 2,5 ml aufgefüllt. Als Leerwert wurde 2,5 ml Puffer eingesetzt, als Standard diente ein Ansatz von 1,2 μMol MP und 2,5 μMol reduzierten MP's. Nach Eingabe der Ansätze in Schüttelbirnen wurden sie in einem Wasserbad bei 30°C eine Stunde lang geschüttelt. Durch das Schütteln sollte die Eindiffusion von molekularem Sauerstoff erleichtert werden. Nach der Inkubationsperiode wurde die Reaktion mit 500 mg NaCl pro Ansatz, einer jeweils zur Einstellung eines pH-Wertes von 9 noch erforderlichen Volumens einer 0,2 M Tris-Puffer-Lösung, Stamm A,

und 10 ml Chloroform gestoppt. Wieder wurden die Ansätze 15 Min. lang geschüttelt, dann wurden sie 10 Min. lang mit einer Christ-Tischzentrifuge bei 3000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. 8 ml der Chloroformphase wurden in Schüttelbirnen pipettiert und mit einem Vakuumverdampfer (Rotavapor, Fa. Büchi) unter ständigem Rotieren bei einer konstanten Temperatur von 30°C verdampft. Die Verdampfungszeit betrug für jede Birne ca. 10-15 Min. Die Verdampfungsreste wurden nun in je 200 µl Methanol aufgenommen, wobei die Birne so gedreht wurde, daß möglichst alle Wände mit dem Methanol in Berührung kamen und schließlich 40 µl der Lösung (2 x 20 µl) mit einer Konstriktionspipette auf eine Chromatographieplatte (DC-Fertigplatte, Kieselgel F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke: 0,25 mm, Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen. Nach Beendigung der Laufzeit in einem Laufmittel von 10 ml Methanol und 90 ml Chloroform wurden die Platten fotografiert und in Höhe der einzelnen Metaboliten ausgekratzt. Die ausgekratzte Menge wurde in 3 ml 0,1 M Glycin-Puffer (pH 1,3) gelöst. Nach 10-minütiger Zentrifugation in einer Christ-Zentrifuge bei 9000 Umdrehungen wurde der Überstand abpipettiert und in einem Beckman-Spektrophotometer bei 260 und 285 nm gegen einen Leerwert gemessen, da sowohl MP als auch reduziertes MP und die auf oxidativem Weg entstandenen Metaboliten bei 260 nm ein Absorptionsmaximum und bei 285 nm einen isosbestischen Punkt aufweisen. Die Extinktionsdifferenz wurde subtrahiert, der Leerwert abgezogen und unter Benutzung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 1,11 mM⁻¹ cm⁻¹ (KAHL, 1970 a) die im Ansatz vorhandene Menge von MP und reduziertem MP errechnet. Da die Struktur der beiden oxidativ entstehenden Metaboliten noch nicht aufgeklärt ist, können zu diesen keine absoluten quantitativen Angaben gemacht werden.

4. Chemikalien:

Alle verwendeten Substanzen außer 3-(3-Pyridyl)-Propanol (Fa. Merck, Darmstadt) waren von analytischem Reinheitsgrad. MP und reduziertes MP waren Gaben der Fa. CIBA Pharmaceutical Company, Summit, New Jersey, USA. Neotetrazolium-Chlorid und Nagarse stammten von der Fa. Serva, Heidelberg. Cofaktoren und Enzyme sowie Cytochrom c waren Präparate der Fa. Böhringer und Söhne, Mannheim. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase hatte den Reinheitsgrad II. Die Bestandteile des Sörensen-Phosphat-Puffers, der SVT-Lösung (Tris, Na^+ -EDTA, Saccharose), NaCl, NaOH, HCl, pNA, Na-Dithionit, Methanol, Chloroform, Formaldehyd und Anthrachinon-sulfonsäure-(2)-Natriumsalz sowie Pyridin wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. Den hochgereinigten Stickstoff lieferte die Fa. Linde, Mainz-Kastell; das Kohlenmonoxid die Fa. Gerling, Holz & Co., Hanau. Phenobarbital-Natriumsalz und Hexobarbital schließlich stammten aus der Hausapotheke der Universität Mainz.

5. Statistische Auswertung:

Die angegebenen Mittelwerte stellen das arithmetische Mittel der Meßergebnisse dar. Mittelwerte sowie die einfache Standardabweichung und die mittleren Fehler des Mittelwertes wurden maschinell auf einem Wang "Series 700 A"-Rechner nach Programmen des Pharmakologischen Institutes durchgeführt. Wenn auf Unterschiede zwischen Mittelwerten getestet wurde, wurde der t-Test nach Student für unverbundene Stichproben ebenfalls maschinell gerechnet. Die Ermittlung der P-Werte erfolgte bei zweiseitiger Fragestellung.

E R G E B N I S S E

1. Vergleichende Untersuchung über Eiweißgehalt, Gesamt-
hämgehalt, Cytochrom b_5 - und Cytochrom P-450-Gehalt
von PB-stimulierten Mikrosomen vor und nach Behandlung
mit Nagarse:

1.1. Eiweißausbeute

Nach Behandlung von Mikrosomenpräparationen mit Nagarse ging ein Teil der eingesetzten Eiweißmenge verloren. Wie Tabelle II zeigt, werden sowohl bei den Vergleichsmikrosomen als auch bei den Nagarse-Partikeln nur etwa 50-60% der eingesetzten Eiweißmenge wiedergefunden.

Da der größte Teil des Cytochroms b_5 und der NADPH-Cytochrom c-Reduktase durch die Proteolyse solubilisiert wurde, war zu erwarten, daß ein gewisser Anteil von Eiweiß im Überstand der mit Nagarse behandelten Mikrosomen erscheint. Der Nachweis von Protein im Nagarse-Überstand gelang mit der relativ empfindlichen Methode nach LOWRY bei Eingabe eines zehnfach höheren Volumens, als es für die Proteinbestimmung bei Nagarse-Partikeln notwendig ist, während im Vergleichsüberstand Protein nicht sicher nachgewiesen werden konnte.

Bei der Bilanzierung der Eiweißausbeute der Nagarsepräparationen bleibt der der Nagarse eigene Proteingehalt, der, bedingt durch die Löslichkeit dieser Proteinase, vermutlich im Nagarse-Überstand mitbestimmt wurde, unberücksichtigt. Dies mag eine Erklärung für den Befund sein, daß Nagarse-Partikeln und Nagarse-Überstand zusammen ca. 80% der ursprünglichen Proteinmenge enthielten: von 100 mg eingesetzten mikrosomalen Proteins werden ca. 55 mg in der den Nagarse-Partikeln entsprechenden Präparation sowie ca. 25 mg im Nagarse-Überstand wieder gefunden. Dagegen betrug die Ausbeute an Eiweiß bei Vergleichsmikrosomen und Vergleichsüberstand nur etwa 55%. Die insgesamt relativ kleine Aus-

beute erklärt sich vermutlich aus den Verlusten durch Pipettieren, Zentrifugieren und Homogenisieren. Bei diesen Vorgängen bleibt immer ein gewisser Anteil Eiweiß in der Pipette oder in Gefäßen haften. Ähnliche Eiweißverluste sind auch von anderen Untersuchern, die Mikrosomen entweder einer Isolierungs- und Reinigungsprozedur (LU und LEVIN, 1972) oder einer Isooktanextraktion (LEIBMAN und ESTABROOK, 1971) unterzogen, beschrieben worden.

Tabelle II: Wiedergefundener Anteil der ursprünglich eingesetzten Proteinmenge nach Behandlung mit Nagarse.

Eingesetzte bzw. wiedergefundene Proteinmenge (mg)	
PBM	100
VM	50,34 $\pm$ 7,38
NgP	51,76 $\pm$ 4,26
VÜ	0
NgÜ	26,00 $\pm$ 1,36

Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ einfache Standardabweichung dar (n=5).

1.2. Gesamthämgehalt

Der Hämgehalt in den Nagarse-Partikeln und im Nagarse-Überstand erreicht nicht den der Ausgangsmikrosomen, so daß der Hämverlust insgesamt den Eiweißverlust noch übertrifft (Tab.III). Auffällig ist, daß der in Vergleichsmikrosomen gemessene Hämgehalt gegenüber den Ausgangsmikrosomen höhere Werte ergibt, wobei unklar ist, worauf diese Differenz zurückgeht.

Tabelle III: Hämgehalt vor und nach Behandlung mit Nagarse.

Gesamthämgehalt (nMol Häm/mg Protein)	
PBM	2,63 ± 0,34
VM	3,08 ± 0,21*
NgP	1,50 ± 0,39**
VÜ ⁺	0,06 ± 0,01
NgÜ ⁺⁺	0,94 ± 0,35

Die Werte stellen das arithmetische Mittel ± einfache Standardabweichung dar (n=5). *p < 0,05,

**p < 0,01 gegenüber PBM

+ bezogen auf 2 ml Überstand

++ Beim Bezug auf mg Protein bleibt der Anteil der Nagarse am Proteingehalt unberücksichtigt.

1.3. Cytochrom b₅-Gehalt

Cytochrom b₅ wurde durch Nagarse zum großen Teil aus der mikrosomalen Membran herausgelöst. Tabelle IV zeigt die Solubilisierung von Cytochrom b₅ nach Andauen von PB-Mikrosomen mit Nagarse. Während in den Kontrollversuchen mit Vergleichsmikrosomen kein Cytochrom b₅ im Überstand aufgefunden wird, verbleibt nach Behandlung mit Nagarse nur ein geringer Rest des Cytochrom b₅ in den Mikrosomen; der überwiegende Teil findet sich im Überstand. Die Menge solubilisierten Cytochroms erscheint dabei immer höher, als dem Hämgehalt im Nagarse-Überstand entspricht, was möglicherweise auf einer Änderung des Extinktionskoeffizienten für Cytochrom b₅ durch den Solubilisierungsvorgang zurückzuführen ist.

Tabelle IV: Cytochrom b_5 -Gehalt vor und nach Behandlung mit Nagarse.

Cytochrom b_5 -Gehalt (nMol Cyt. b_5 /mg Protein)	
PBM	0,69 $\pm$ 0,05
VM	0,74 $\pm$ 0,06
NgP	0,10 $\pm$ 0,06
VÜ ⁺	0
NgÜ ⁺⁺	1,44 $\pm$ 0,34

Die angegebenen Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ einfache Standardabweichung dar (n=5).

⁺ eingesetztes Volumen: 2 ml

⁺⁺ Beim Bezug auf mg Protein bleibt der Anteil der Nagarse am Proteingehalt unberücksichtigt.

1.4. Cytochrom P-450 - Gehalt

Die Untersuchung des zweiten Hämoproteins der Mikrosomenfraktion, des Cytochrom P-450, ergibt weiteren Aufschluß über die Eigenschaften von Nagarse-behandelten Mikrosomenpräparationen. Während sich in PB-Mikrosomen nach CO-Begasung keine Absorption bei 420 nm zeigt, findet sich sowohl in Vergleichsmikrosomen als auch in Nagarse-Partikeln eine kleine Schulter bei 420 nm, die auf eine quantitativ nicht ins Gewicht fallende Konversion von Cytochrom P-450 zu Cytochrom P-420 durch die Inkubationsprozedur hinweist. Trotzdem ergibt sich, wie Tabelle V zeigt, daß nur etwa 50% des ursprünglichen Cytochrom P-450-Gehalts in den Nagarse-Partikeln wiedergefunden wurde.

Tabelle V: Cytochrom P-450-Gehalt vor und nach
Behandlung mit Nagarse.

Cytochrom P-450-Gehalt (nMol Cyt.P-450/mg Protein)	
PBM	1,77 $\pm$ 0,50
VM	2,04 $\pm$ 0,39
NgP	0,92 $\pm$ 0,18
VÜ ⁺	0,09 $\pm$ 0,003
NgÜ ⁺⁺	0,07 $\pm$ 0,01

Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ einfache Standardabweichung dar (n=5).

+ bezogen auf 2 ml Überstand

++ Beim Bezug auf mg Protein bleibt der Anteil der Nagarse am Proteingehalt unberücksichtigt.

Verantwortlich für diese Differenz dürfte möglicherweise das während der Behandlung entstandene "endogene CO", das an das Cytochrom P-450 gebunden wird, sein, da bei der Messung im Differenzspektrum durch den Ausgleich des Extinktionsunterschiedes zwischen den beiden eingegebenen Proben der CO-gebundene Anteil des Cytochrom P-450 nicht erscheint. Nach Reduktion eines Ansatzes mit Dithionit, der im Differenzspektrum mit einem oxidierten Ansatz verglichen wird, ist dieser CO-gebundene Anteil jedoch nachweisbar. Wie aus Tabelle VI zu ersehen ist, beträgt der Anteil von CO-gebundenem Cytochrom P-450 im Vergleich zu dem Teil, an den noch CO gebunden werden kann - hier erfolgte die Messung ebenfalls reduziert gegen oxidiert - 38% in Nagarse-Partikeln, sowie 8,5% in VM. Bei der Bilanzierung des Cytochrom P-450 fällt noch eine zwar

kleine, aber doch meßbare Menge an Cytochrom P-450 im Vergleichsüberstand und im Nagarse-Überstand auf, die zeigt, daß allein durch die mechanische Prozedur bei der Nagarseinkubation ein, wenn auch sehr kleiner, Anteil des Cytochroms in den Überstand übergeht.

Tabelle VI: Extinktion von reduzierten gegenüber oxidierten Mikrosomen bei 450 nm vor und nach CO-Begasung.

	ΔE_{450} red./ox.		%
	vor CO-Begasung	nach CO-Begasung	
VM	0,017 $\pm$ 0,002	0,200 $\pm$ 0,020	8,5
NgP	0,035 $\pm$ 0,013	0,099 $\pm$ 0,020	35,6

Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ einfache Standardabweichung dar (n=3-5).

* Extinktion vor CO-Begasung als % der Extinktion nach CO-Begasung angegeben.

2. Der Einfluß von Nagarse auf die weiteren Bestandteile der mikrosomalen Elektronentransportkette:

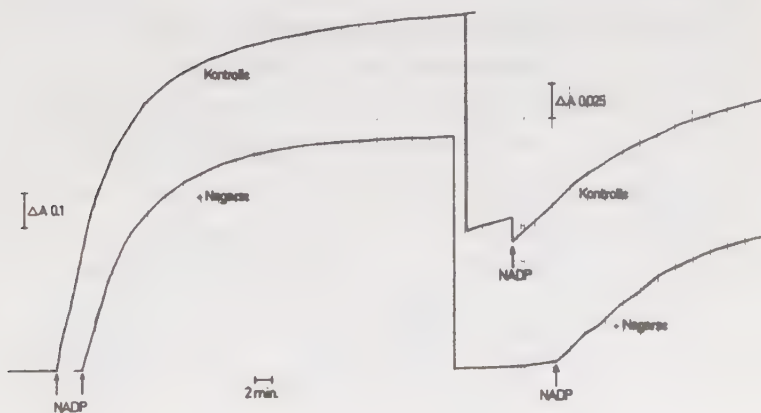
2.1. NADPH-regenerierendes System

Abbildung 1 zeigt die NADP-Reduktion im NADPH-regenerierenden System, in Puffer gelöst, in Abwesenheit und Anwesenheit von Nagarse. Dabei wird sichtbar, daß zwar unter dem Nagarseeinfluß die Menge des im NADPH-regenerierenden System erzeugten reduzierten NADP gegenüber dem Vergleichsansatz niedriger ist. Jedoch ist das regenerierende System nach der Einstellung eines gegenüber Nagarse-freien Ansätzen verminderten Anfangsspiegels weiterhin in der Lage, NADP zu reduzieren. Wird nämlich dann eine geringe Menge NADP zugegeben, so er-

folgt die Reduktion im Ansatz mit Nagarse mit gleicher Geschwindigkeit wie im Vergleichsansatz.

Im Ansatz mit Nagarse-Partikeln und NADPH-regenerierendem System kann derselbe Vorgang beobachtet werden. Nach der Einstellung eines etwas niedrigeren Niveaus an reduziertem NADP als in PB-Mikrosomen wird anschließend zugegebenes NADP weiter reduziert.

Abbildung 1: Einfluß von Nagarse auf die NADP-Reduktion im NADPH-regenerierenden System.



Das NADPH-regenerierende System bestand aus 1,5 μmol G6P, 1,2 Einheiten G6PDH sowie 0,065 M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) in einem Endvolumen von 2,5 ml. Bei der ersten Zugabe wurde mit 1,2 μmol NADP, bei der zweiten mit 0,12 μmol NADP gestartet.

2,2. Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität und die Neotetrazoliumdiaphoraseaktivität

Die Solubilisierung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase gelang in unserer Versuchsanordnung vollständig. Während die Nagarse-Partikeln keine Restaktivität aufweisen, kann im Überstand, der nach Nagarse-Behandlung gewonnen wurde, eine hohe Aktivität wiedergefunden werden (Tab.VII). Sie entspricht in einigen Versuchen der Aktivität der Vergleichsmikrosomen, liegt jedoch in anderen Versuchen noch wesentlich höher. Im Vergleichsüberstand ist jedoch keine Reduktion von Cytochrom c zu finden.

Tabelle VII: Solubilisierung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase durch Nagarse.

NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität
(nMol reduziertes Cyt.c/min x mg Protein)

Versuch Nr.	PBM	VM	NgP	VÜ ⁺	NgÜ ⁺⁺
1	140	150	0	0	240
2	125	127,6	0	0	140
3	90	120	0	0	228
4	96,1	107,6	0	0	895,2
5	136	97,1	0	0	1246

⁺ eingesetztes Volumen vgl. Methoden

⁺⁺ Beim Bezug auf mg Protein blieb der Anteil der Nagarse am Proteingehalt unberücksichtigt.

Die Neotetrazoliumdiaphorase, die mit der NADPH-Cytochrom c-Reduktase in Zusammenhang stehen soll (WILLIAMS et al., 1959), kann nach Nagarse-Behandlung ebenfalls im Überstand nachgewiesen werden. Diese Aktivität wird jedoch in Anwesenheit von Nagarse stark gehemmt, was Kontrollversuche mit PB-Mikrosomen nach Beigabe 375 µg

Nagarse in den Ansatz zeigen. Gekochte Nagarse hemmt die Neotetrazoliumdiaphorase nicht. Daß es sich bei der im Nagarse-Überstand gemessenen Formazanbildung um einen enzymatischen Umsatz handelt, wird durch Kontrollversuche mit gekochtem Nagarse-Überstand, der keinerlei Aktivität aufweist, bestätigt.

Tabelle VIII: Solubilisierung der Neotetrazoliumdiaphorase durch Nagarse.

Neotetrazoliumdiaphorase-Aktivität (nMol Formazan/10 min x mg Protein)							
Versuch Nr.	PBM	VM	NgP	VÜ ⁺	NgÜ ⁺	PB+Ng	PB+Ng ⁰
1	497,5	487,5	o	o	122,5	55	600
2	550	612,5	o	o	137,5	57,5	540
3	627	605	o	o	750	162,5	600
4	326,7	275	o	o	62,5	21,4	312,5
5	323,2	312,5	o	o	30,4	--	--

⁺ eingesetztes Volumen vgl. Methoden

⁺⁺ Beim Bezug auf mg Protein bleibt der Anteil der Nagarse am Proteingehalt unberücksichtigt.

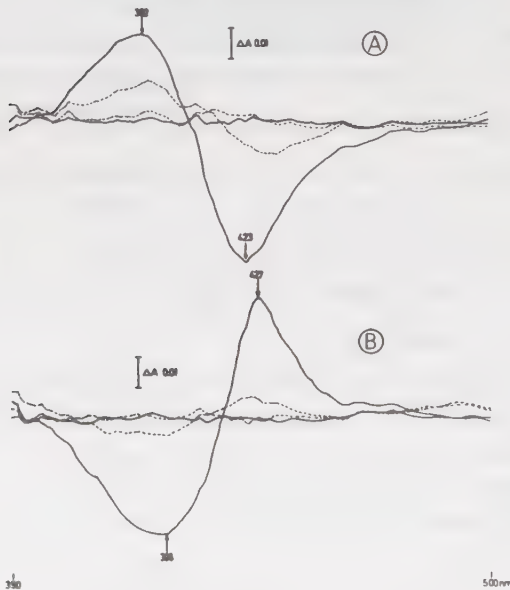
3. Substratbindung:

3.1. Bindung von Typ I- und Typ II-Substraten an Nagarse-Partikeln

Zur Prüfung der Bindungsfähigkeit von Nagarse-Partikeln für Substrate wurden Hexobarbital als Typ I-Substrat (Absorptionsmaximum bei 392 nm, Absorptionsminimum bei 423 nm) und MP als Typ II-Substrat (Absorptionsmaximum bei 427 nm und Absorptionsminimum bei 398 nm) verwendet. Abbildung 2 zeigt, daß Mikrosomen auch nach Nagarse-Behandlung noch in der Lage sind, beide Typen von Substratbindungsspektren hervorzubringen. Aller-

dings war das Ausmaß der spektralen Veränderungen bei Bindung beider Substrate gegenüber den Ausgangsmikrosomen erheblich vermindert.

Abbildung 2: Bindungsspektrum von Hexobarbital und Metyrapon in PB-Mikrosomen und Nagarse-Partikeln.



A: 5×10^{-3} M Hexobarbital B: $1,7 \times 10^{-4}$ M MP
————— PBM - - - - - NgP

Im Ansatz befanden sich 1 mg Protein/ml bei einem pH von 7,4.

3.2. Bindung von Metyrapon und 3-Pyridyl-Propanol an reduzierte Nagarse-Partikeln.

Das durch MP in reduziert gehaltenen Mikrosomen hervorgerufene Absorptionsmaximum bei 446 nm ist auch in Nagarse-Partikeln nachweisbar. Die dabei gemessene Extinktion ist in Nagarse-Partikeln wesentlich geringer als in PB-Mikrosomen und Vergleichsmikrosomen. Dieses

Ergebnis ist offenbar auf die Verringerung des Gehalts an nicht CO-gebundenem Cytochrom P-450 zurückzuführen. Bezieht man nämlich die bei 446 nm gemessene Extinktion auf die in der jeweiligen Präparation bei 450 nm gemessene Extinktion, ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Nagarse-Partikeln und Ausgangs- bzw. Vergleichsmikrosomen (Tab.IX). Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß die Bindungsfähigkeit des reduzierten Cytochrom P-450 für das Pyridinderivat durch die Nagarse-Behandlung nicht wesentlich verringert wird. Der CO-gebundene Anteil des Cytochrom P-450 wurde in diese Berechnung nicht einbezogen, da CO ein stärkerer Ligand als MP ist (JONEN et al., 1974) und dieser Anteil deshalb für die Bindung des MP nicht in Frage

Tabelle IX: Absorption bei 446 nm und 450 nm vor und nach Behandlung mit Nagarse.

MP:

	$\Delta E_{446 \text{ nm}}$	$\Delta E_{450 \text{ nm}}^*$	$\frac{\Delta E_{446 \text{ nm}}}{\Delta E_{450 \text{ nm}}}$
PBM	$0,085 \pm 0,016$	$0,170 \pm 0,030$	0,50
VM	$0,103 \pm 0,007$	$0,185 \pm 0,035$	0,56
NgP	$0,038 \pm 0,008$	$0,084 \pm 0,016$	0,45

3-Pyridyl-Propanol:

PBM	$0,065 \pm 0,012$	$0,170 \pm 0,030$	0,38
VM	$0,078 \pm 0,013$	$0,185 \pm 0,035$	0,42
NgP	$0,036 \pm 0,010$	$0,084 \pm 0,016$	0,42

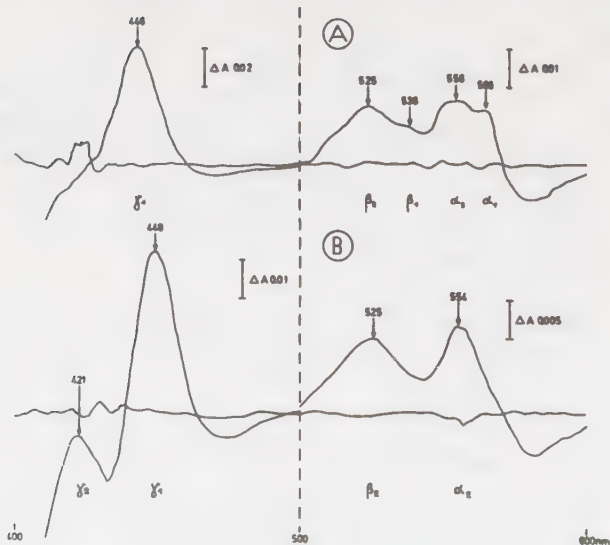
Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ einfache Standardabweichung dar (n=3-5).

* gemessen in Ansätzen ohne MP

kommen dürfte. Untersuchungen über die Bindung von 3-Pyridyl-Propanol ergaben ein vergleichbares Ergebnis. In den Überständen konnte nach Zugabe einer gleichen Menge MP keine Änderung der Extinktion gefunden werden.

Das MP-bedingte Spektrum in reduzierten Nagarse-Partikeln weist gegenüber demjenigen in PB-Mikrosomen und Vergleichsmikrosomen einige Unterschiede auf (Abb.3). Nach Zugabe von $1,7 \times 10^{-4}$ M MP zu dithionit-

Abbildung 3: Differenzspektrum von dithionitreduzierten PB-Mikrosomen und Nagarse-Partikeln in Gegenwart von MP.



A: PB-Mikrosomen B: Nagarse-Partikeln

Im Ansatz befanden sich 1 mg Protein/ml und 1 mg Natriumdithionit/ml bei einem pH von 7,8. Die Konzentration von MP betrug $1,7 \times 10^{-4}$ M.

reduzierten Nagarse-Partikeln sieht man einen Gipfel bei 425 nm, der in den Ausgangsmikrosomen nicht vorkommt. Gleichzeitig kann aber die Doppelgipfligkeit im langwelligen Bereich nicht mehr beobachtet werden. Die Absorptionsmaxima bei 555 und 527 nm sind noch ausgebildet, während bei 567 und 539 nm keine Gipfel mehr zu sehen sind. 3-Pyridyl-Propanol (10^{-2} M) erzeugt ein ähnliches Bindungsspektrum mit reduzierten Nagarse-Partikeln wie MP, wobei die Gipfel bei 425, 555 und 527 nm noch deutlicher ausgeprägt sind als in den MP-bedingten Spektren.

4. Arzneimittelstoffwechsel nach Inkubation mit Nagarse.
Vergleichende Untersuchungen am oxidativen und reduktiven Stoffwechsel:

4.1. pNA-Demethylierung

Tabelle X zeigt, daß nach Behandlung von PB-Mikrosomen mit Nagarse die pNA-Demethylierung nicht in Gang kommt. Unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Nagarse, inkubierte Vergleichsmikrosomen sind zur O-Demethylierung von pNA noch in fast vollem Ausmaß in der Lage. Die in Vergleichsmikrosomen erhaltenen Werte kommen den durch PB-Mikrosomen erzielten Umsätzen

Tabelle X: pNA-Demethylierung vor und nach Behandlung mit Nagarse.

pNA-demethylierende Aktivität
(nMol p-Nitrophenol/min x mg Protein)

PBM	4,13 ± 0,78
VM	3,68 ± 1,25
NgP	0

Die angegebenen Werte stellen das arithmetische Mittel + mittleren Fehler des Mittelwertes dar (n=4-5).

sehr nahe. Die Prüfung sowohl des Nagarse-Überstandes als auch des Vergleichsüberstandes auf eine pNA-demethylierende Aktivität bleibt ohne Ergebnis. In beiden Überständen ist keine p-Nitrophenol-Bindung nachweisbar. Kontrollversuche zur akuten Einwirkung von Nagarse weisen auf einen inhibitorischen Effekt der Nagarse bei dieser Reaktion hin.

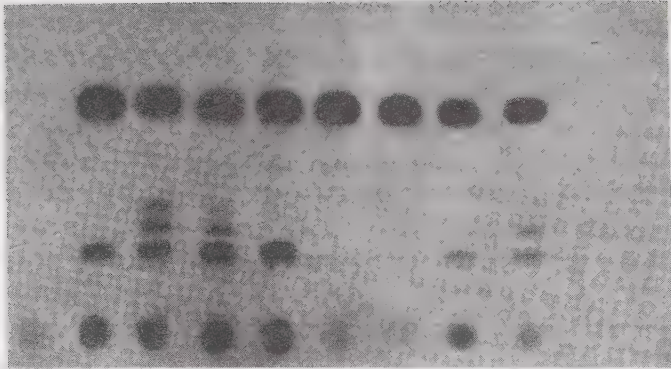
4.2. Metyraponstoffwechsel

Aus dem Chromatogramm in Abbildung 4 wird ersichtlich, daß nach Inkubation von PB-Mikrosomen mit Nagarse ein oxidativer Metabolismus von Metyrapon nicht mehr stattfindet, während der reduktive Umsatz durchaus erhalten bleibt.

Tabelle XI zeigt die quantitative Ausbeute an den drei Metaboliten. Dabei erweist sich, daß die Bildung von reduziertem MP in den Vergleichsmikrosomen schneller abläuft als in den PB-Mikrosomen. Noch deutlicher wird der reduktive Umsatz in Nagarse-Partikeln beschleunigt. Diese Unterschiede könnten dadurch bedingt sein, daß bei verminderter bzw. wegfallender Oxidation von MP mehr NADPH für die Reduktion zur Verfügung steht.

Bei Mitinkubation von aktiver Nagarse in PB-Mikrosomen wird der oxidative Stoffwechsel wie bei den Nagarse-Partikeln gehemmt. Der reduktive Metabolismus bleibt noch voll nachweisbar. Wird durch Kochen inaktivierte Nagarse eingesetzt, sind auch die oxidativ gebildeten Metaboliten zu finden.

Abbildung 4: Einfluß von Nagarse auf den Metyrapon-
stoffwechsel.



LW Std PBM VM NgP NgÜ VÜ PBM PBM
+Ng +Ng^o

2,5 mg mikrosomales Protein bzw. 2,5 mg Protein des
Nagarse-Überstandes bzw. 2 ml des Vergleichsüberstan-
des wurden unter Standardbedingungen 60 Min. lang in-
kubiert. Die Metaboliten wurden auf einer Dünnschicht-
chromatographieplatte (DC-Fertigplatten, Kieselgel
F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Fa.Merck/Darm-
stadt) in Methanol - Chloroform (10 : 90, V/V) ge-
trennt und unter UV-Licht bei 254 nm fotografiert
(LW = Leerwert; Std = Standard).

Daß diese mikrosomalen Aktivitäten nicht solubilisierbar sind, weder was den oxidativen, noch was den reduktiven Metabolismus betrifft, zeigen die Untersuchungen am Nagarse-Überstand und am Vergleichsüberstand. Beide weisen keine Aktivität gegenüber Metyrapon als Substrat auf.

Tabelle XI: Ausbeute der einzelnen Metaboliten vor und nach Behandlung mit Nagarse.

	reduziertes MP (μ Mol/60 min x mg Protein)	durch oxidativen Abbau entstehende Metaboliten	
		I ΔE	II ΔE
PBM	$0,78 \pm 0,13$	$0,050 \pm 0,009$	$0,037 \pm 0,007$
VM	$1,38 \pm 0,13$ *	$0,031 \pm 0,004$	$0,020 \pm 0,002$
NgP	$1,62 \pm 0,12$ *	0	0
PBM+Ng	$1,10 \pm 0,14$	0	0
PBM+Ng ^O	$1,21 \pm 0,09$ **	$0,068 \pm 0,006$	$0,042 \pm 0,004$

Die angegebenen Werte stellen das arithmetische Mittel + mittleren Fehler des Mittelwertes dar (n=4-5).

* $p < 0,01$; ** $p < 0,02$ gegenüber PBM.

D I S K U S S I O N

1. Die mikrosomale Elektronentransportkette nach Nagarsedigestion:

Die Untersuchung der mikrosomalen Elektronentransportkette bringt auf Grund ihrer komplexen Struktur oft die Notwendigkeit mit sich, einzelne Bausteine herauszubrechen und gesondert zu analysieren. Unter den verschiedenartigen Möglichkeiten des Eingriffs, mit denen jeweils auch die verschiedenen Bestandteile der Mikrosomen, wie Lipide, Proteine, Häm und RNS, entweder in ihrer Chemie oder in ihrer Funktion eine genauere Charakterisierung erfahren können, ist die Behandlung von Mikrosomen mit Proteinasen schon mehrmals beschrieben worden (ORRENIUS et al., 1969; SATO et al., 1969; ITO und SATO, 1969).

Gleich anderen Proteasen wie Trypsin bewirkt dabei Nagarse, ein aus "Bacillus subtilis" gewonnenes proteolytisches Agens, eine selektive Solubilisierung des Cytochrom b_5 und der NADPH-Cytochrom c-Reduktase, während andere Bestandteile der Elektronentransportkette, vor allem Cytochrom P-450, nicht aus ihrer Membranbindung lösbar sind (ITO und SATO, 1969). Gerade der selektive Digestionseffekt der Nagarse, außerdem ihre Eigenschaft, im Vergleich zu anderen Proteasen, die zu einer fast vollständigen Konversion des Cytochrom P-450 zu Cytochrom P-420 führen, relativ schonend auf das Cytochrom P-450 einzuwirken (SATO et al., 1969), erlauben die Herstellung von sogenannten P-450 Partikeln, die fast frei von der störenden Interferenz des Cytochrom b_5 sind.

Vergleichbar mit der Arbeit von SATO et al. (1969), die durch die Solubilisierung von Cytochrom b_5 die Messung eines Absolutspektrums von Cytochrom P-450 ermöglichten, ist in unseren Versuchen Cytochrom b_5 nach Nagarsebehandlung zum größten Teil in Lösung gegangen (Tab.IV). In seiner Eigenschaft als Hämoprotein ist es im Überstand nach Zentrifugieren durch die Eiweißbestimmung, den Nach-

weis des Hämgehaltes sowie durch seine spektrale Erscheinung nach Reduktion deutlich charakterisierbar.

Dabei fällt auf, daß entgegen den Befunden von SATO et al. (1969), die nur eine geringe Menge solubilisierter NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase finden, das durch Nagarse gelöste Cytochrom b_5 durch NADH fast vollständig reduzierbar ist. Für eine Lokalisation der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase an Membrananteilen, die einer Digestion zugänglich sind, sprechen jedoch Untersuchungen von TAKESUE und OMURA (1968), die von einer selektiven und fast vollständigen Solubilisierung des Flavoproteins nach Inkubation von Mikrosomen mit Lysosomen berichten.

Für die Tatsache, daß in unseren Ergebnissen der Gehalt an gelöstem Cytochrom b_5 höher erscheint, als der Gehalt an gelöstem Häm in PB- oder Vergleichsmikrosomen gemessen wird, mag vielleicht ein veränderter Extinktionskoeffizient verantwortlich sein. Diese Annahme stützt sich nicht zuletzt auf Daten von SATO et al. (1969) über zwei durch verschiedene Methoden - einmal mit Trypsin, ein anderes Mal mit einem Detergens - gereinigte Cytochrom b_5 -Hämproteine, die sich in ihren molekularen Eigenschaften deutlich unterschieden. Zudem konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden, daß sich die gemessene Absorption des reduzierten Cytochrom b_5 bei der zur Bestimmung in den Überständen eingesetzten kleinen Eiweißmenge nicht mehr im Bereich linearer Abhängigkeit von der Eiweißkonzentration befindet.

Das zweite Hämoprotein, Cytochrom P-450, bleibt entsprechend der Vorstellung von ITO und SATO (1969), die den Sitz dieses Enzyms in einem für Makromoleküle, wie sie Proteinasen darstellen, nicht permeablen Säckchen vermuten, während die löslichen Enzyme auf der Außenseite lokalisiert sind, fest in seiner Membranhafung. Es wird mit den Membrananteilen sedimentiert und nach Resuspension auf Grund seiner spektralen Charakteristik, einem Absorptionsmaximum bei 450 nm nach Reduktion und Begasung mit CO, identifiziert. Bei den in dieser Arbeit untersuchten

Präparationen ist, analog zu der Arbeit von SATO et al. (1969), nur eine geringe Konversion zu Cytochrom P-420 meßbar, nicht zuletzt infolge des Schutzeffektes von Glycerin, der nach ICHIKAWA und YAMANO (1967 b) generell allen Polyolen zugeschrieben werden kann. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob nicht ein Teil des konvertierten Cytochroms in Lösung gegangen ist, und so der Verlust an Cytochrom P-450 nach Nagarsedigestion um etwa 50%, wie er in dieser Arbeit berichtet wird (Tab.IV), eine Deutung findet. Dagegen spricht allerdings, daß im Überstand keine spektrale Erfassung von Cytochrom P-420 möglich war. Ein Vergleich von Hämgehalt und Cytochrom b_5 -Gehalt im Überstand deutet außerdem darauf hin, daß die Konzentration dieses Hämoproteins dem gemessenen Hämgehalt entspricht, berücksichtigt man noch einen eventuell veränderten Extinktionskoeffizienten für das in Lösung befindliche Cytochrom. Für die Beteiligung eines anderen Hämoproteins am Hämgehalt des Überstandes bleibt bei der Bilanzierung kaum mehr Platz.

Für die im Differenzspektrum gemessene, nach Nagarsebehandlung erheblich geringere Ausbeute an Cytochrom P-450 mag es jedoch noch andere Interpretationsmöglichkeiten geben. So ist eine Maskierung des wahren Hämoproteingehaltes im Differenzspektrum durch Kohlenmonoxid, das während der Inkubation gebildet wurde, denkbar. Die Formierung von CO während der Inkubation von Mikrosomen mit NADPH wird von NISHIBAYASHI et al. (1967) nachgewiesen. In solchen Fällen ist bei der Bestimmung von Cytochrom P-450 im Differenzspektrum nach Reduktion und CO-Begasung der durch "endogenes CO" bereits maskierte Pigmentanteil abgeglichen und kommt nicht mehr zur Erscheinung. Die bei uns präparierten Nagarse-Partikeln, aber auch, in geringerem Maße, die Vergleichsmikrosomen, zeigen in jedem Falle trotz kontinuierlicher N_2 -Begasung einen relativ großen Anteil von bereits CO-maskiertem Cytochrom P-450. Bei der Messung im Differenzspektrum, wobei in diesem Falle der dithionitreduzierte Ansatz vor und nach CO-Begasung mit

dem oxidierten verglichen wird, erhalten wir ca. 40 bzw. 10% von bereits CO-gebundenem Cytochrom P-450 (Tab. VI). Nach SHACTER et al. (1973) ist die Formierung von CO in Gegenwart von NADPH das Resultat des Hämabbaus, welches von Cytochrom P-450 stammt. Dieser Hämabbau ist vergesellschaftet mit der Lipidperoxidation, von der die mikrosomalen Phospholipide in Gegenwart von NADPH und Sauerstoff betroffen sind (SHACTER et al., 1973; NISHIBAYASHI et al., 1967; LEVIN et al., 1973). Möglicherweise ist auch der in dieser Arbeit gezeigte Verlust von Cytochrom P-450 (Tab. V) durch den Abbau von Häm während der Inkubation verursacht. Den Cofaktor für diesen Reaktionsvorgang stellen dabei eventuelle mitochondriale Verunreinigungen dar.

Die Bindung von Substrat an das Cytochrom P-450 und das dadurch erscheinende Spektrum entweder vom Typ I (z.B. Hexobarbital) mit einem Tal bei 420-422 nm und einem Gipfel bei 388nm oder vom Typ II (z.B. MP) mit einem Absorptionsmaximum bei 425 - 435 nm und einem Minimum bei 390 - 405 nm ist schon von vielen Autoren beschrieben worden. LEIBMAN und ESTABROOK (1971) berichten jedoch über das Unvermögen von Mikrosomen nach Extraktion von Phospholipiden durch Isooktan zur Bildung von Typ I-Spektren, während das Typ II-Spektrum unverändert bleibt. Daraus wird von LEIBMAN und ESTABROOK (1971) der Zusammenhang von Typ I-Bindung und dem Phospholipidgehalt des Cytochrom P-450 gefolgert. Nach Steapsinbehandlung oder längerer Lagerung von Mikrosomen im Kühlraum sehen ebenfalls SHOEMAN et al. (1969 a) eine Herabsetzung der Bindungsfähigkeit von Typ I-Substraten. Für uns war es nun interessant, der Frage der Substratbindung nach Behandlung von Mikrosomen mit einer Proteinase nachzugehen. Wir sehen dabei (Abb. 2) keine selektive Bevorzugung oder Behinderung der Bindung von Typ I- oder Typ II-Substraten an Nagarse-Partikeln, jedoch ist die Bindung von beiden Substraten vermindert, was aber wohl auch auf den scheinbaren Verlust von Cytochrom p-450 nach Nagarsebehandlung zurückzuführen ist.

Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase, ein Flavoprotein, ist in der Elektronentransportkette für die Reduktion von Cytochrom P-450 verantwortlich. Ihre Aktivität kann durch die Reduktionsgeschwindigkeit von beigegebenem Cytochrom c nachgewiesen werden, wobei als Cofaktor NADPH fungiert. Dieses Flavoprotein kann durch Lipasen (WILLIAMS et al., 1962) oder Proteinasen wie Trypsin (PHILLIPS und LANGDON, 1962) aus Lebermikrosomen gelöst werden. Entsprechend den Befunden von ITO und SATO (1969) ist in unserer Arbeit durch Nagarse bei einer eingegebenen Konzentration von 150 µg/mg Protein eine vollständige Solubilisierung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase zu erzielen (Tab.VII). In einigen Fällen ist dabei die Reduktaseaktivität durch die Nagarsedigestion gegenüber dem mikrosomalen Umsatz, der mit Werten von 120 nMol/min x mg Protein im Bereich der Literatur liegt, vor allem, wenn man noch das Fehlen des den Umsatz stabilisierenden KCN berücksichtigt (GILLETTE und GRAM, 1969; HERNANDEZ et al., 1967: 220 nMol/min x mg Protein), um ein Vielfaches gesteigert. In ähnlicher Weise konnten HERNANDEZ et al. (1967) nach Steapsinsolubilisierung der Reduktase und anschließender Reinigung eine deutliche Aktivitätssteigerung beobachten. Diese Autoren machten die mögliche Ausschaltung eines Inhibitors oder auch die Änderung der molekularen Konfiguration durch die Behandlung für die gesteigerte Aktivität verantwortlich.

Interessanterweise kann auch die mit der NADPH-Cytochrom c-Reduktase vergesellschaftete Neotetrazoliumdiaphorase durch Nagarsebehandlung in Lösung gebracht werden. Der Umsatz von Neotetrazolium, der bei uns in PB-stimulierten Mikrosomen etwa um den Faktor 4 niedriger ausfällt, als er bei HERNANDEZ et al. (1967) von unstimulierten Mikrosomen berichtet wird, ist nach Solubilisierung gegenüber dem Umsatz in Lebermikrosomen vermindert. Dies kann eventuell, wie Kontrollversuche zeigen, auf die Wirkung der Nagarse zurückgeführt werden. Interessanterweise wird ein Verlust von Neotetrazoliumdia-

phoraseaktivität nach Behandlung mit Lipase in der Literatur ebenfalls berichtet (WILLIAMS et al., 1959). In Partikeln, die nach Inkubation mit Nagarse gewonnen wurden, ist keinerlei Aktivität meßbar, wasein Indiz für die Solubilisierung der Neotetrazoliumdiaphorase sein mag.

2. Spektrale Charakteristik von Pyridinderivaten mit Nagarse-Partikeln.

Nach Zugabe von MP zu reduziert gehaltenen Mikrosomen erhält man im Differenzspektrum eine charakteristische Soretbande bei 446 nm, verbunden mit Absorptionsmaxima im langwelligen Bereich bei 567 und 557 nm sowie bei 539 und 523 nm (HILDEBRANDT et al., 1969). Außer mit MP zeigt sich dieses Spektrum auch mit anderen Pyridinderivaten, wobei allerdings im Soretbereich eine zweite Bande bei 425 nm auftritt und die Extinktion bei 523 und 557 nm gegenüber 539 und 567 nm stärker hervorgehoben ist (JONEN et al., 1974). Hingegen erscheint mit MP als Ligand der Soretpeak bei 425 nm in PB-stimulierten Mikrosomen nur sehr flüchtig (JONEN et al., 1974). Die langwelligen Absorptionsmaxima bei 523 nm und 557 nm wurden von HILDEBRANDT et al. (1969) als die Bildung von typischen Pyridinhämochromen durch MP diskutiert. JONEN (1973) konnte nachweisen, daß sämtliche Pyridinderivate mit Häminchlorid zur Bildung von Pyridinhämochromogenen befähigt sind.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß bei "P-450-Partikeln", die nach Nagarsedigestion gewonnen wurden, neben anderen Pyridinderivaten auch MP ein im Soretbereich doppelgipfliges Spektrum bilden kann. Im langwelligen Bereich sind bei allen Pyridinderivaten einschließlich MP allein noch die Maxima bei 523 und 557 nm sichtbar. Dieses Pyridinhämochromogenspektrum scheint allein durch das Cytochrom P-450 verursacht zu werden, da nur noch wenig Cytochrom b_5 in den Partikeln vorhanden ist.

Während nun einerseits eine Bindungscharakteristik für Pyridinderivate an Cytochrom P-450 offensichtlich die eines typischen Pyridinhämochromogens ist, ist die Frage der Herkunft der weiteren spektralen Eigenarten von Pyridinderivaten weiterhin ungeklärt. Aufgrund der Maxima im langwelligen Bereich bei 539 und 567 nm diskutieren HILDEBRANDT et al. (1969) eine cyanidähnliche Bindung. Nach HILL et al. (1970) bildet Cyanid mit Protohäm langwellige Banden bei 540 und 570 nm. Aufschlußreich erscheinen in diesem Zusammenhang jedoch auch Untersuchungen von ULLRICH und SCHNABEL (1973), die nach Bindung von Fluoren an reduzierte Mikrosomen ein Bindungsspektrum beschreiben, das mit einem Soret-Peak bei 446 nm sowie α - und β -Banden bei 568 bzw. 540 nm den langwelligen Anteilen der Soret-, α - und β -Region im Spektrum von MP und anderen Pyridinderivaten fast genau gleicht. Verantwortlich für dieses Spektrum ist dabei das als Carbanion an das Hämoprotein gebundene Fluoren. Durch MP kann es aus dieser Bindung verdrängt werden, was für eine gemeinsame Bindungsstelle spricht. Wie bei der MP-Bindung (KAHL et al., im Druck) ist die bei der Carbanionbindung durch kleine Ligandenkonzentrationen hervorzurufende Absorption bei 446 nm durch 3-MC-Induktion nicht erhöht; dagegen zeigt sich nach PB-Induktion eine starke Zunahme der Absorption (ULLRICH und SCHNABEL, 1973).

Einen weiteren Gesichtspunkt zur Deutung des MP-Spektrums in Nagarse-Partikeln liefert auch ein Vergleich des Nagarseeinflusses mit der Wirkung einer pH-Verschiebung. Die Zunahme der Extinktion bei 425 nm gegenüber der bei 446 nm, sowie das alleinige Erscheinen der langwelligen Absorptionsmaxima bei 523 und 557 nm unter Wegfall der Gipfel bei 539 und 568 nm, wie es in dieser Arbeit für Nagarse-Partikeln gezeigt wird, ist dem Effekt, der durch Senkung oder Erhöhung des für die Ausprägung des 446 nm-Gipfels optimalen pH's von 7,8 auf die Bindung von Pyridinderivaten zu erzielen ist (JONEN et al., 1974), sehr ähnlich. JONEN (1973) zeigt, daß Altern oder Erhitzen

von Mikrosomen eine Abnahme der langwelligen Banden bei 539 nm und 567 nm bewirkt und nimmt an, daß dieser spektralen Veränderung ein Eingriff in die Eiweißkonformation zugrunde liegt. Es wäre nach dieser Vorstellung denkbar, daß die Bindungscharakteristik von Pyridinderivaten durch Veränderung von Proteinanteilen infolge der Nagarsebehandlung beeinflußt werden kann.

3. Der Einfluß einer Proteinasebehandlung auf die Stoffwechselaktivität von Mikrosomen:

Die nach Nagarsedigestion gewonnenen Partikeln, die weitgehend frei von Cytochrom b_5 (Tab.IV) und von Bestandteilen der mikrosomalen Elektronentransportkette wie der NADPH-Cytochrom c-Reduktase und Neotetrazoliumdiaphorase (Tab.VII und VIII) sind, ermöglichen die Reduktion von Metyrapon zu Metyrapol, während ein oxidativer Stoffwechselweg (TÜTTENBERG, 1974) von MP durch Nagarsebehandlung blockiert wird. Die Reduktion von MP, die als Hauptstoffwechselweg dieser Substanz beschrieben wurde (SPRUNT et al., 1967; KRAULIS et al., 1968; KAHL, 1970 a), wird durch mikrosomale Enzyme unter Abhängigkeit von NADPH gesteuert (KAHL, 1970 a). Dies gibt zu einem Vergleich mit der ebenfalls mikrosomalen Azo- und Nitroreduktase (GILLETTE, 1966) Anlaß. Aufgrund der Bindungsspektren von MP mit oxidierten bzw. reduzierten Mikrosomen sowie der Eigenschaft dieser Substanz, den Stoffwechsel von Typ-I Substraten zu hemmen, außerdem den der Typ-II Substrate unterschiedlich zu beeinflussen (LEIBMAN, 1969; HILDEBRANDT et al., 1969), wird für die MP-Reduktion eine Beziehung zur mischfunktionellen Oxidierung diskutiert (KAHL, 1970 a), ähnlich, wie sie GILLETTE et al. (1968) für die Nitroreduktase annehmen.

Die enge Beziehung der Nitroreduktase zum Arzneimittel hydroxylierenden System wurde von GILLETTE et al. (1968) aufgrund von Befunden diskutiert, die zum einen die CO-Hemmbarkeit dieser Reduktase zeigen, zum andern auf die

PB-Stimulierbarkeit der Reaktion sowie auf die vergleichbare Empfindlichkeit von Cytochrom P-450 und Nitroreduktase gegenüber Tetrachlorkohlenstoff verweisen. Die Metyraponreduktase kann dagegen durch CO nicht gehemmt werden und ist auch nicht durch PB stimulierbar (KAHL, Habilitationsarbeit, 1970 b).

Unsere Befunde zeigen, daß die MP-Reduktase durch Proteinasebehandlung nicht solubilisierbar ist. Dagegen kann die Azoreduktase nach Steapsinbehandlung leicht solubilisiert werden. Die Aktivität der solubilisierten Azoreduktase ist dabei parallel der ebenfalls solubilisierten NADPH-Cytochrom c-Reduktase (HERNANDEZ et al., 1967), die in unserem Falle nach Nagarsedigestion ebenfalls in Lösung gebracht wurde. Damit scheint ein Zusammenhang zwischen diesem Flavoprotein und der MP-Reduktase ausgeschlossen. Eine Verwandtschaft zur Neotetrazoliumdiaphorase, wie sie von HERNANDEZ et al. (1967) ebenfalls für die Azoreduktase gezeigt wird, scheint aufgrund unserer Befunde in gleicher Weise unwahrscheinlich.

Nach den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen ist die Ausbeute an reduzierten Metaboliten bei Nagarse-Partikeln um den Faktor 2 höher als in den Ausgangsmikrosomen. Eine Erklärung für diesen Befund könnte eine Konkurrenz des reduktiven Abbauweges mit einem zweiten Stoffwechselweg, der wahrscheinlich in Abhängigkeit von der mischfunktionellen Oxidierung steht, darstellen. Dieser Metabolismus von MP wird nur bei reichlichem Sauerstoffangebot in Form von zwei zusätzlichen Stoffwechselprodukten sichtbar und erscheint nach PB-Induktion deutlich erhöht.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Behandlung von Mikrosomen mit Nagarse einen oxidativen Stoffwechsel, wie ihn die O-Demethylierung von pNA modellhaft darstellt, vollkommen inhibiert. Der sauerstoffabhängige Metabolismus von MP ist in der gleichen Weise behindert, so daß eine Konkurrenz um die reduzierenden Äquivalente für

den reduktiven Abbau einerseits und für den oxidativen Abbau andererseits, wie sie in unbehandelten Mikrosomen stattfindet, wegfällt. Deshalb erscheint wohl der reduktive Stoffwechsel hier gegenüber den Ausgangsmikrosomen bevorzugt.

Für die Blockierung des oxidierten MP durch Nagarse dürfte der Einfluß der Nagarse auf das NADPH-regenerierende System (Abb. 1) nicht entscheidend sein. Dagegen scheint es möglich, daß das während der Inkubation von Mikrosomen mit Nagarse gebildete endogene CO, von dem die Rede war, den oxidativen Stoffwechsel hemmt. Wahrscheinlich ist jedoch auch, daß der Elektronentransport zum Cytochrom P-450 durch die Solubilisierung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase unterbrochen ist. Unter diesen Umständen ist ein oxidativer Stoffwechsel nicht zu erwarten. So zeigen MASTERS et al. (1973) mit Hilfe von Antikörpern gegen dieses Flavoprotein die Hemmung der Demethylierung von Äthylmorphin nach Unterbrechung des Elektronentransportes an der Stelle des Flavoproteins.

Die angeführten Faktoren für die Blockierung des oxidativen Stoffwechsels von Metyrapon durch Nagarsedigestion, einmal eine Hemmung durch endogenes CO, zum andern die Unterbrechung des Elektronentransportes, können ein Indiz für die Beteiligung der Cytochrom P-450 abhängigen mischfunktionellen Oxidierung an diesem Stoffwechselweg sein. Inwieweit dabei die von ULLRICH und SCHNABEL (1973) aufgrund der spektralen Verwandtschaft von Fluoren und Metyrapon diskutierte Carbanionbildung, die ebenfalls CO-empfindlich ist, eine Rolle spielt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Durch proteolytische Behandlung von phenobarbital-stimulierten Rattenlebermikrosomen mit der unspezifischen Proteinase Nagarse wird das mikrosomale Cytochrom b_5 solubilisiert. In den Nagarse-Partikeln findet sich ein Cytochrom b_5 -Gehalt von 0,10 nMol/mg Protein gegenüber 0,74 nMol/mg Protein in den Vergleichsmikrosomen, während der bei der Präparation der Nagarse-Partikeln anfallende Überstand 1,44 nMol Cytochrom b_5 /mg Protein enthält. Der durch Begasung mit Kohlenmonoxid darstellbare Gehalt an Cytochrom P-450 ist nach Nagarsedigestion von 1,77 auf 0,92 nMol/mg Protein vermindert. Eine Konversion zu Cytochrom P-420 ist für diese Verminderung des Cytochrom P-450-Gehalts nicht verantwortlich. Dagegen läßt sich zeigen, daß 35% des insgesamt vorhandenen Cytochrom P-450 bereits an während der Nagarsebehandlung entstandenes Kohlenmonoxid gebunden vorliegt. Berücksichtigt man diesen Anteil, so errechnet sich im Gesamt-Cytochrom P-450-Gehalt von 1,40 nMol/mg Protein; ein wesentlicher Cytochrom P-450-Verlust tritt demnach durch die Nagarsebehandlung nicht auf. Das Absinken des Hämgehalts von 3,08 auf 1,50 nMol/mg Protein spiegelt zum großen Teil die Solubilisierung des Cytochrom b_5 durch die Nagarse wider.
2. Aerobe Nagarse-Partikeln zeigen ein vermindertes Bindungsvermögen sowohl für Typ I-Substrate als auch für Typ II-Substrate. Dagegen findet man in reduziert gehaltenen Nagarse-Partikeln keine wesentlich verringerte Bindungsfähigkeit für die Pyridinderivate Metyrapon und 3-Pyridyl-Propanol. Allerdings weist das durch diese Pyridinderivate in Nagarse-Partikeln hervorgerufene Spektrum einige Unterschiede gegenüber den Spektren in Vergleichsmikrosomen auf. Im Soretbereich zeigen sich im Gegensatz zu Vergleichsmikro-

somen auch mit Metapyron als Ligand zwei Absorptionsmaxima bei 425 und 446 nm, während im sichtbaren Bereich nur zwei Absorptionsmaxima bei 527 und 555 nm gegenüber den in Vergleichsmikrosomen nachweisbaren vier Absorptionsmaxima bei 527, 539, 555 und 567 nm auftreten. Die mögliche Abhängigkeit der Bindungscharakteristik der Pyridinderivate vom Cytochrom b_5 -Gehalt und von der Eiweißkonformation der Mikrosomen wird diskutiert.

3. Die Reduktion von NADP durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Gegenwart von Glucose-6-phosphat wird unter dem Einfluß der Nagarse verlangsamt. Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase und die Neotetrazoliumdiaphorase werden durch die Nagarsebehandlung solubilisiert; während sich im Nagarseüberstand eine relativ hohe Aktivität dieser Enzyme nachweisen läßt, verbleibt in den Nagarse-Partikeln keine Restaktivität.
4. Die von Cytochrom P-450 als Endoxidase katalysierte O-Demethylierung von p-Nitroanisol sowie der sauerstoffabhängige Abbau von Metyrapon können in Nagarse-Partikeln nicht nachgewiesen werden. Demgegenüber scheint der reduktive Stoffwechsel von Metyrapon bei Wegfall der beiden durch oxidativen Abbau entstandenen Metaboliten bevorzugt. Von den geprüften Stoffwechselvorgängen konnte keiner durch Nagarsedigestion solubilisiert werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S
=====

ALVARES, A.P., G.SCHILLING, W.LEVIN and R.KUNTZMAN: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Biochem.biophys.Res.Comm. 29, 521 (1967)

ARCOS, J.C., A.H.CONNEY and N.P.BUU-HOI: Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes. J.Biol.Chem. 236, 1291 (1961)

AXELROD, J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine. J.Pharmacol.Exper.Therap. 115, 259 (1955)

BARON, J. and T.R.TEPHLY: Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the stimulation of hepatic microsomal heme synthesis and induction of hepatic microsomal oxidases produced by phenobarbital. Molec.Pharmacol. 5, 10 (1969)

BIDLEMAN, K. and G.J.NANNERING: Induction of drug metabolism. V. Independent formation of cytochromes P-450 and P₁-450 in rats treated with phenobarbital and 3-methylcholanthrene simultaneously. Molec.Pharmacol. 6, 697 (1970)

BRODIE, B.B.: Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. Science 121, 603 (1955)

CAMMER, W., J.B.SCHENKMAN and R.W.ESTABROOK: EPR measurements of substrate interaction with cytochrome P-450. Biochem.biophys.Res.Comm. 23, 264 (1968)

CHANCE, B. and G.R.WILLIAMS: Kinetics of cytochrome b₅ in rat liver microsomes. J.Biol.Chem. 209, 945 (1954)

- CHART, J.J. and H.J. SHEPPARD: Pharmacology and biochemistry of some amphenone analogues and other adrenal cortical inhibitors. *J.med.pharm.Chem.* 1, 407 (1959)
- CLAUDE, A.: *Proc.Soc.exp.biol.Med.* 39, 398 (1938); zit. nach CLAUDE, A.: Microsomes, endoplasmatic reticulum and interactions of cytoplasmic membranes. In: GILLETTE, J.R., A.H.CONNEY, G.J.COSMIDES, R.W.ESTABROOK, J.R.FOUTS and G.J.MANNERING (Eds): *Microsomes and drug oxidations*. Academic Press, New York, London 1969
- COHEN, B.S. and R.W.ESTABROOK: Microsomal electron transport reactions. I. Interaction of reduced triphosphopyridine nucleotide during the oxidative demethylation of aminopyrine and cytochrome b₅ reduction. *Archs Biochem.Biophys.* 143, 37 (1971 a)
- CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol.Rev.* 19, 317 (1967)
- CONNEY, A.H., R.R.BROWN, J.A.MILLER and E.C.MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Intracellular distribution and properties of the demethylase system. *Cancer Res.* 17, 628 (1957)
- CONNEY, A.H. and A.G.GILMAN: Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *J.Biol.Chem.* 238, 3682 (1963)
- CONNEY, A.H., E.C.MILLER and J.A.MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 16, 450 (1956)

- CONNEY, A.H., E.C. MILLER and J.A. MILLER: Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 228, 753 (1957)
- COOPER, J.R. and B.B. BRODIE: The enzymatic metabolism of hexobarbital (Evipal). *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 114, 409 (1955)
- COOPER, D.Y., R.W. ESTABROOK and O. ROSENTHAL: The stoichiometrie of C₂₁-hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. *J. Biol. Chem.* 238, 1320 (1962)
- COOPER, D.Y., S. LEVIN, S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL and R.W. ESTABROOK: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400 (1965 a)
- COOPER, D.Y., S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL and R.W. ESTABROOK: Spectral and kinetic studies of microsomal pigments. In: KING, T.E., H.S. MASON and M. MORRISON (Eds.): *Oxidases and related redox systems*. Wiley, New York (1965 b) p. 838
- DALLNER, G., P. SIEKEVITZ and G.E. PALADE: Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. II. Synthesis of constitutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte. *J. cell. Biol.* 30, 97 (1966)
- DAS, M.L., S. ORRENTUS and L. ERNSTER: On the fatty acid and hydrocarbon hydroxylation in rat liver microsomes. *Europ. J. Biochem.* 4, 519 (1968)
- DOMINGUEZ, O.V. and L.T. SAMUELS: Mechanism of inhibition of adrenal steroid 11 β -hydroxylase by methopirapone (metopirone). *Endocrinology* 73, 304 (1963)

- ELLIN, A., S. ORRENIUS, A. PILOTTI and C. G. SWAHN: Cytochrome P-450_K of rat kidney cortex microsomes: Further studies on its interaction with fatty acids. *Archs Biochem. Biophys.* 158, 597 (1973)
- ERNSTER, L. and S. ORRENIUS: Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes. *Fed. Proc.* 24, 1190 (1965)
- ESTABROOK, R. W., D. Y. COOPER and O. ROSENTHAL: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C₂₁-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Zschr.* 338, 741 (1963)
- ESTABROOK, R. W., A. HILDEBRANDT, H. REMMER, J. B. SCHENKMAN, O. ROSENTHAL and D. Y. COOPER: The role of cytochrome P-450 in microsomal mixed function oxidation reactions. In: HESS, B. and H. J. STAUDINGER (Eds.): 19 Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, pp. 142-177. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969
- FUJITA, T. and G. J. MANNERING: Differences in soluble P-450 hemoproteins from livers of rats treated with phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Chem. Biol. Interactions* 3, 264 (1971)
- FUJITA, T., D. W. SHOEMAN and G. J. MANNERING: Differences in P-450 cytochromes from livers of rats treated with phenobarbital and with 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 248, 2192 (1973)
- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I.: Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archs Biochem. Biophys.* 77, 493 (1958)

- GAYLOR, J.L., N.J. MOIR, E. SEIFRIED and C.R.E. JEFCOATE:
Assay and isolation of a cyanid-binding protein
of rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 245,
5511 (1970)
- GELBOIN, H.V. and N.R. BLACKBURN: The stimulatory effect
of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxy-
lase activity in several rat tissues. Inhibition
by actinomycin D and puromycin. *Cancer Res.* 24,
356 (1964)
- GIGON, P.L., T.E. GRAM and J.R. GILLETTE: Studies on the
rate of reduction of hepatic microsomal cyto-
chrome P-450 by reduced nicotinamide adenine
dinucleotide phosphate: effect of drug substrates.
Molec. Pharmacol. 5, 109 (1969)
- GILLETTE, J.R.: Biochemistry of drug oxidation and re-
duction by enzymes in hepatic endoplasmic reti-
culum. *Advanc. Pharmacol.* 4, 219 (1966)
- GILLETTE, J.R.: Mechanism of oxidation by enzymes in the
endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 16, 109 (1969)
- GILLETTE, J.R.: Metabolism of drugs and other foreign
compounds by enzymatic mechanisms. *Fortschr.*
Arzneimittelforsch. 6, 11 (1963)
- GILLETTE, J.R., B.B. BRODIE and B.N. LADU: The oxidation of
drugs by liver microsomes: on the role of TPNH
and oxygen. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 119, 532
(1957)
- GILLETTE, J.R. and T.E. GRAM: Cytochrome P-450 reduction
in liver microsomes and its relationship to drug
metabolism. In GILLETTE, J.R., A.H. CONNEY, G.J.
COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J.R. FOUTS and G.J.
MANNERING (Eds.): *Microsomes and drug oxidations*.
Academic Press, New York, London 1969

- GILLETTE, J.R., J.J.KAMM and H.A.SASANE: Mechanism of p-nitrobenzoate reduction in liver: the possible role of cytochrome P-450 in liver microsomes. *Molec.Pharmacol.* 4, 541 (1968)
- GREENE, F.E., B.STRIPP and J.R.GILLETTE: Effect of methylcholanthrene or phenobarbital pretreatment of rabbits and rats on the extinction coefficient for cytochrome P-450. *Pharmacology* 5, 43 (1971)
- GREIM, H., J.B.SCHENKMAN, M.KLOTZBÜCHER and H.REMMER: The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b₅ and cytochrome P-450 hemes in the rat. *Biochem.biophys.Acta* 201, 20 (1970)
- HASHIMOTO, T., T.YAMANO and H.S.MASON: An electron spin resonance study of microsomal electron transport. *J.Biol.Chem.* 237, 3843 (1962)
- HAYAISHI, O., S.ROTHBERG and A.H.MEHLER: Studies on enzymatic oxygenation. 130th Am.Chem.Soc. Meeting (1956) p. 53
- HERNANDEZ, P.H., J.R.GILLETTE and P.MAZEL: Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. I. Azoreductase activity of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. *Biochem.Pharmacol.* 16, 1859 (1967)
- HERNANDEZ, P.H., P.MAZEL and J.R.GILLETTE: Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. II. The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on carbon monoxide sensitive and insensitive azoreductase activities. *Biochem.Pharmacol.* 16, 1877 (1967)

- HILDEBRANDT, A.G. and R.W. ESTABROOK: Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed function oxidation reactions. Archs Biochem. Biophys. 143, 66 (1971)
- HILDEBRANDT, A.G., K.C. LEIBMAN and R.W. ESTABROOK: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital. Biochem. biophys. Res. Commun. 37, 477 (1969 b)
- HILDEBRANDT, A.G., H. REMMER and R.W. ESTABROOK: Cytochrome P-450 of liver microsomes - one pigment or many. Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 607 (1969 a)
- HILL, A.A.O., A. RÖDER and R.J.P. WILLIAMS: The chemical nature and reactivity of cytochrome P-450. Structure and Bonding, Springer Verlag 8, 123 (1970)
- ICHIKAWA, Y. and T. YAMANO: Electron spin resonance of microsomal cytochromes. Correlation of the amount of CO-binding species with so-called microsomal Fe_x in microsomes of normal tissues and liver microsomes of sudan III-treated animals. Archs Biochem. Biophys. 121, 742 (1967 a)
- ICHIKAWA, Y. and T. YAMANO: The role of the hydrophobic bonding in P-450 and the effect of organic compounds on the conversion of P-450 to P-420. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 147, 518 (1967 b)
- IMAI, Y. and R. SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. Biochem. biophys. Res. Commun. 22, 620 (1966)

- IMAI,Y. and R.SATO: Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and other reagents. Europ.J. Biochem. 1, 419 (1967 a)
- IMAI,Y. and R.SATO: Anomalous spectral interactions of reduced P-450 with ethyl isocyanide and some other lipophilic ligands. J.Biochem. (Tokyo) 62, 464 (1967 b)
- IMAI,Y. and R.SATO: Dual effect of ethyl isocyanide on drug hydroxylation by liver microsomes. J.Biochem. (Tokyo) 63, 380 (1968)
- ITO,A. and R.SATO: Proteolytic microdissection of smooth-surfaced vesicles of liver microsomes. J.cell.Biol. 40,179 (1969)
- JEFCOATE,C.R.E. and J.L.GAYLOR: Ligand interactions with cytochrome P-450. II.Influence of phenobarbital and methylcholanthrene induction processes on P-450 spectra. Biochemistry 8, 3464 (1969)
- JEFCOATE,C.R.E., J.L.GAYLOR and R.L.CALABRESE: Ligand interactions with cytochrome P-450. I.Binding of primary amines. Biochemistry 8, 3455 (1969)
- JICK,H. and L.SHUSTER: The turnover of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome c reductase in the liver of mice treated with phenobarbital. J.Biol.Chem. 241, 5366 (1966)
- JONEN,H.G.: Spektralanalytische Befunde zur Wechselwirkung von Pyridinderivaten mit dem Cytochrom P-450. Medizinische Dissertation, Mainz 1973

- JONEN, H.G., B.HÜTHWOHL, R.KAHL and G.F.KAHL: Influence of pyridine and some pyridine derivatives on spectral properties of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing activity. Im Druck (1974)
- KAHL, G.F.: Experiments on the metapyrone reducing microsomal enzyme system. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 266, 61 (1970 a)
- KAHL, G.F.: Untersuchungen zu Stoffwechsel und Wirkung von Metyrapon in der Leberzelle. Habilitationsschrift, Mainz (1970 b)
- KAHL, G.F., K.MINCK and K.J.NETTER: Enhancement of type-II substrate oxidation and of azo reduction in the isolated rat liver and in vitro by metyrapone. Drug Metab.Disposition 1, 191 (1973)
- KAHL, G.F. and K.J.NETTER: The effect of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxidation. Biochem.Pharmacol. 19, 27 (1970)
- KAHL, G.F. and S.SIMON: Action of metyrapone on the redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide and on oxygen consumption of perfused rat livers and isolated mitochondria. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 268, 1 (1971)
- KAHL, R. and KAHL, G.F.: Interaction of metyrapone and reduced metyrapone with cytochrome P-446. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.Supplement to Vol. 270, (1971)
- KAHL, R., H.G.JONEN and G.F.KAHL: Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene administration in vivo and iso-octane extraction in vitro on metyrapone binding to reduced cytochrome P-450. (im Druck)

- KAMIN, H., B.S.S. MASTERS, Q.H. GIBSON and C.H. WILLIAMS:
Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. Fed.
Proc. 24, 1164 (1965)
- KELTZ, A. and J.E. LOVELOCK: Effect of concentrated salt
solutions on the β -lipoproteins of human plasma.
Fed. Proc. 14, 84 (1955)
- KLINGENBERG, M.: Pigments of rat liver microsomes.
Archs Biochem. Biophys. 75, 379 (1958)
- KRAULIS, I. and M.K. BIRMINGHAM: Hydroxylation sequences
in rat adrenal steroids and effects of Su 4885
on c_{18} -oxygenation. Fed. Proc. 22, 530 (1963)
- KRAULIS, I., H. TRAIKOV, M.P. LI, C.P. LANTOS and M.K.
BIRMINGHAM: The reduction of Su-4885 by adrenal
glands and other tissues and its inhibition by
ACTH. Canad. J. Biochem. 46, 463 (1968)
- LEIBMAN, K.C.: Effects of metyrapone on liver microsomal
drug oxidations. Molec. Pharmacol. 5, 1 (1969)
- LEIBMAN, K.C. and R.W. ESTABROOK: Effects of extraction
with isooctane upon the properties of liver
microsomes. Molec. Pharmacol. 7, 26 (1971)
- LEIBMAN, K.C., A.G. HILDEBRANDT and R.W. ESTABROOK: Spec-
trophotometric studies of interactions between
various substrates in their binding to microso-
mal cytochrome P-450. Biochem. biophys. Res.
Commun. 36, 789 (1969)
- LEYBOLD, K. und H.J. STAUDINGER: Geschlechtsunterschiede
im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikroso-
men. Biochem. Zschr. 331, 389 (1959)

- LEVIN, W., A.Y.H. LU, M. JACOBSON, R. KUNTZMAN, J. L. POYER and P. B. McCAY: Lipid peroxidation and the degradation of cytochrome P-450 heme. *Archs Biochem. Biophys.* 158, 842 (1973)
- LIDDLE, G. W., D. ISLAND, E. M. LANCE and A. P. HARRIS: Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 β -hydroxylation. *J. clin. Endocr.* 18, 906 (1958)
- LIER, A.: Zur Frage der Beeinflussung des oxidativen und reduktiven Fremdstoffumbaus in den Mikrosomen der Rattenleber durch Metyrapon. Medizinische Dissertation, Mainz 1972
- LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR and R. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
- LU, A. Y. H. and W. LEVIN: Partial purification of cytochromes P-450 and P-448 from rat liver microsomes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 46, 1334 (1972)
- LU, A. Y. H., S. B. WEST, D. RYAN and W. LEVIN: Characterization of partially purified cytochromes P-450 and P-448 from rat liver microsomes. *Drug Disposition* 1, 29 (1973)
- MANNERING, G. J.: Properties of cytochrome P-450 as affected by environmental factors: qualitative changes due to administration of polycyclic Hydrocarbons. *Metabolism* 20, 2 (1971 a)
- MASON, H. S.: Mechanism of oxygen metabolism. *Advances Enzymol.* 19, 79 (1957)

MASON, H.S., J.C. NORTH and M. VANNESTE: Microsomal mixed function oxidations: the metabolism of xenobiotics. Fed.Proc. 24, 1172 (1965 a)

MASTERS, B.S.S., H. KAMIN, Q.H. GIBSON and C.H. WILLIAMS, Jr.: Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. J.Biol.Chem. 240, 921 (1965)

MASTERS, B.S.S., E.B. NELSON, B.A. SCHACTER, J. BARON and E.L. ISAACSON: NADPH-cytochrome c reductase and its role in microsomal cytochrome P-450-dependent reactions. Drug Metab. Disposition 1, 121 (1973)

MINCK, K., G.F. KAHL, R. KERN, A. LIER and G. NISSEN: Influence of metyrapone and hypoxia on neoprontosil and acetanilide metabolism in isolated rat livers. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 274, Suppl., R 79 (1972)

MINCK, K., R.R. SCHUPP, H.P.A. ILLING, G.F. KAHL and K.J. NETTER: Interrelationship between demethylation of p-nitroaniline and conjugation of p-nitrophenol in rat liver. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 279, 347 (1973)

MITOMA, C. and S. UDENFRIED: Enzymatic hydroxylation of aromatic drugs. J. Pharmacol. Exper. Therap. 113, 40 (1955)

MIYAKE, Y., J.L. GAYLOR and H.S. MASON: Properties of a submicrosomal particle containing P-450 and flavoprotein. J.Biol.Chem. 243, 5788 (1968)

NARASIMHULU, S., D.Y.COOPER and O.ROSENTHAL: Spectrophotometric properties of a triton clarified steroid 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes. Life Sci. 4, 2101 (1965)

NETTER, K.J.: Eine Methode zur direkten Messung der O-Demethylierung und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmwirkung von SKF 525-A. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 238, 292 (1960)

NETTER, K.J., S.JENNER and K.KAJUSCHKE: Über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimitelabbau. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 259, 1 (1967)

NETTER, K.J., G.F.KAHL and M.P.MAGNUSSON: Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 265, 205 (1969)

NISHIBAYASHI, H., H.T.OMURA, R.SATO and R.W.ESTABROOK: In OKONUKI, K., M.D.KAMEN and I.SUKUZU (Eds.): Structure and function of cytochromes, p.351 University Park Press, Baltimore, 1967

OMURA, T.: In GILLETTE, J.R., A.H.CONNEY, G.J.COSMIDES, R.W.ESTABROOK, J.R.FOUTS and G.J.MANNERING (Eds.): Microsomes and drug oxidations. Academic Press, New York, London 1969, p.160/161

OMURA, T. and R.SATO: A new cytochrome in liver microsomes. J.Biol.Chem. 237, 1375 (1962)

- OMURA, T. and R. SATO: Fractional solubilization of haemoproteins and partial purification of carbon monoxide-binding cytochrome from liver microsomes. *Biochim. biophys. Acta* 71, 224 (1963)
- OMURA, T. and R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemo-protein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964 a)
- OMURA, T. and R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379 (1964 b)
- OMURA, T., R. SATO, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL and R. W. ESTABROOK: Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed. Proc.* 24, 1181 (1965)
- ORRENIUS, S., A. BERG and L. ERNSTER: Effects of trypsin on the electron transport systems of liver microsomes. *Europ. J. Biochem.* 11, 193 (1969)
- ORRENIUS, S., G. DALLNER and L. ERNSTER: Inhibition of the TPNH-linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 14, 329 (1964)
- ORRENIUS, S. and L. ERNSTER: Phenobarbital induced synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver microsomes. *Biochim. biophys. Res. Commun.* 16, 60 (1964)
- ORRENIUS, S., J. L. E. ERICSSON and L. ERNSTER: Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes. A morphological and biochemical study. *J. cell. Biol.* 25, 627 (1965)

OSHINO, N., Y. IMAI and R. SATO: Electron-transfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed by liver microsomes. *Biochem. biophys. Acta* 128, 13 (1966)

OSHINO, N., Y. IMAI and R. SATO: A function of cytochrome b_5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 69, 155 (1971)

OSHINO, N., Y. IMAI and R. SATO: Stimulation by phenols of the reoxidation microsomal bound cytochrome b_5 and its implication to fatty acid desaturation. *J. Biochem. (Tokyo)* 69, 169 (1971)

PALADE, G. E.: Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In: GAEBLER, O. H. (Eds.): *Enzymes, units of biological structure and function*. Academic Press, New York 1956, p. 185

PAPPENHEIMER, A. M., Jr. and C. M. WILLIAMS: Cytochrome b_5 and the dihydrocoenzyme oxidase system in the cecropia silkworm. *J. Biol. Chem.* 209, 915 (1954)

PEISACH, J. and W. E. BLUMBERG: EPR-study of the high- and low-spin forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from a methylcholanthrene-treated rabbit. *Proc. nat. Acad. Sci.* 67, 172 (1970)

PETERSON, J. A.: Camphor binding by *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Archs Biochem. Biophys.* 144, 678 (1971)

PETERSON, J. A., V. ULLRICH and A. G. HILDEBRANDT: Netyrapone interaction with *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Archs Biochem. Biophys.* 145, 531 (1971)

- PHILLIPS, A.H. and R.G. LANGDON: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization and kinetic studies. J.Biol.Chem. 237, 2652 (1962)
- PHILPOT, R.M. and E. HODGSON: A cytochrome P-450-piperonyl butoxide spectrum similar to that produced by ethyl isocyanide. Life Sci. 10, 503 (1971)
- POSNER, H.S., C. MITOMA, S. ROTBERG and S. UDENFRIED: Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. III.: Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. Archs Biochem. Biophys. 94, 280 (1961)
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 235, 279 (1959)
- REMMER, H.: The induction of hydroxylating by drugs. FEBS letters 16, 125 (1969)
- REMMER, H. und H.J. MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischen Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). Klin.Wschr. 41, 276 (1963)
- REMMER, H.J., J.B. SCHENKMAN, R.W. ESTABROOK, H. SASAME, J. GILLETTE, D.Y. COOPER, S. NARASIMULU and O. ROSENTHAL: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Molec. Pharmacol. 2, 187 (1966)
- ROOTS, I. and A.G. HILDEBRANDT: Non-competitive and competitive inhibition of mixed function oxidase in rat liver microsomes by metyrapone. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 277, 103 (1973)

RYAN, K.G. and L. ENGEL: Hydroxylation of steroids at carbon 21. J. Biol. Chem. 225, 103 (1957)

SASANE, H.A. and J.R. GILLETTE: Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. Molec. Pharmacol. 5, 123 (1969)

SASANE, H.A. and J.R. GILLETTE: Studies on the inhibitory effects of various substances on drug metabolism by liver microsomes: the effect of nicotinamide in altering the apparent mechanism of inhibition. Biochem. Pharmacol. 19, 1025 (1970)

SATO, R., H. NISHIBAYASHI and A. ITO: Characterization of two hemoproteins of liver microsomes. In J.R. GILLETTE, J.R., A.H. CONNEY, G.J. COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J.R. FOUTS and G.J. MANNERING (Eds.): Microsomes and drug oxidations. Academic Press, New York, London 1969

SATO, R., H. SATAKE and Y. IMAI: Partial purification and some spectral properties of hepatic microsomal cytochrome P-450. Drug Metab. Disposition 1, 6 (1973)

SCHACTER, B.A., H.S. MARVER and U.A. MEYER: Heme and hemoprotein catabolism during stimulation of microsomal lipid peroxidation. Drug Metab. Disposition 1, 286 (1973)

SCHENKMAN, J.B., Y. CHA, P. MOLDEUS and D.L. CINTI: Examination of extinction coefficients of soluble and membrane-bound cytochromes P-450 and P-420. Drug Metab. Disposition 1, 516 (1973)

SCHENKMAN, J.B., H.GREIM, M.ZANGE and H.REMMER: On the problem of possible other forms of cytochrome P-450. *Biochim.biophys.Acta* 171, 23 (1969)

SCHENKMAN, J.B., H.REMMER and R.W.ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec.Pharmacol.* 3, 113 (1967 a)

SCHENKMAN, J.B. and R.SATO: The relationship between the pH-induced spectral change of the hepatic microsomal mixed-function oxidase. *Molec.Pharmacol.* 4, 613 (1968)

SHOEMAN, D.W., M.D.CHAPLIN and G.J.MANNERING: Induction of drug metabolism. III. Further evidence for the formation of a new P-450 hemoprotein after treatment of rats with 3-methylcholanthrene. *Molec.Pharmacol.* 5, 412 (1969 a)

SHOEMAN, D.W., J.G.WHITE, G.J.MANNERING: Cytochrome P-450: Tubular aggregates from hepatic microsomes. *Science* 165, 1371 (1969 b)

SLADEK, N.E. and G.J.MANNERING: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene-treated rats. *Biochem.biophys.Res. Commun.* 24, 668 (1966 a)

SLADEK, N.E. and G.J.MANNERING: Induction of drug metabolism. I. Differences in the mechanisms by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital produce their inductive effects on microsomal N-demethylating systems. *Molec.Pharmacol.* 5, 174 (1969)

SPRUNT, J.G., M.C.K.BROWNING and D.M.HANNAH: Some aspects of the pharmacology of metyrapone. *Mem.Soc. Endocrinol.* 17, 193 (1967)

- STERN, J.O., J. PEISACH, W.E. BLUMBERG, A.Y.H. LU and W. LEVIN: A low temperature EPR study of partially purified, soluble ferric cytochromes P-450 and P-448 from rat liver microsomes. *Archs Biochem. Biophys.* 156, 404 (1973)
- STRITTMATTER, P.: The interaction of nucleotides with microsomal cytochrome reductase. *J. Biol. Chem.* 233, 748 (1958)
- STRITTMATTER, C.F. and E.G. BALL: A hemochromogen component of liver microsomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 38, 19 (1952)
- STRITTMATTER, P. and S.F. VELICK: The isolation and properties of microsomal cytochrome. *J. Biol. Chem.* 221, 253 (1956)
- TAKESUE, S. and T. OMURA: Enzymatic solubilization of microsomal NADH-b₅ reductase by lysosomes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 30, 723 (1968)
- TÜTTENBERG, K.H.: Medizinische Dissertation, Mainz 1974
- UEHLEKE, H., U. BREYER, B. BUDCZIES, S. TABARELLI und K.H. HELLMER: Der Einfluß von Metyrapon auf verschiedene Typen von mikrosomalen N-Oxidationen. *Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.* 352, 403 (1971)
- UEHLEKE, H. and K.H. HELLMER: Competitive inhibition of the microsomal N-hydroxylation of 4-chloroaniline by metyrapone and cyclohexane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 268, 242 (1971)
- ULLRICH, V.: On the hydroxylation of cyclohexane in rat liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.* 350, 357 (1969)

- ULLRICH,V., B.S.COMEN, D.Y.COOPER and R.W.ESTABROOK:
Reactions of hemoprotein P-450. In OKONUKI,K.,
M.D.KAMEN and I.SUKUZU (Eds.): Structure and
function of cytochromes, pp. 649-655 University
of Tokyo Press 1968
- ULLRICH,V. and K.H.SCHNABEL: Formation and ligand binding
of the fluorenyl carbanion by hepatic cytochrome
P-450. Archs Biochem.Biophys. 159, 240 (1973)
- NADA,F., H.SHIBATA, N.GOTO and Y.SAKAMOTO: Participation
of the microsomal electron transport system in-
volving cytochrome P-450 in -oxidation of fatty
acids. Biochem.biophys.Acta (Amst.) 162, 518 (1968)
- WATERMAN,N.R. and H.S.MASON: The redox potential of liver
cytochrome P-450. Biochem.biophys.Res.Commun.
39, 451 (1970)
- WILLIAMS,C.H.,Jr., J.GIBBS and H.KAMIN: A microsomal
TPNH-neotetrazoliumdiaphorase. Biochim.bio-
phys.Acta 32, 568 (1959)
- WILLIAMS,C.H.,Jr. and H.KAMIN: Microsomal triphosphopyri-
dine nucleotide-cytochrome c reductase of liver.
J.Biol.Chem. 237, 587 (1962)
- WILSON,L.D., S.B.OLDHAM and B.W.HARDING: Studies on
adrenal cortical cytochrome P-450. II.Effects
of inhibitors of 11 β -hydroxylation on its
optical and magnetic properties. Biochemistry
8, 2975 (1969)
- YONG,F.C., T.E.KING, S.OLDHAM, N.R.WATERMAN and H.S.
MASON: Redox-dependent conformational changes
of rabbit liver cytochrome P-450. Archs Biochem.
Biophys. 138, 90 (1970)

LEBENS LAUF

Am 27. Juli 1946 wurde ich als fünftes Kind des Straßenbaumeisters Paul Niedermeier und dessen Ehefrau Centa, geborene Samberger, in Vilsbiburg/Niederbayern geboren. Im Herbst 1952 wurde ich in meiner Heimatstadt Vilsbiburg eingeschult. Nach Abschluß der fünften Klasse besuchte ich sechs Jahre lang das Albertus Magnus-Gymnasium in Regensburg. Anschließend wechselte ich an das Hans Carossa-Gymnasium in Landshut über, wo ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einsemestrigem Studium der Naturwissenschaften an der Universität Mainz erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium an dieser Hochschule zum Sommersemester 1967 und beendete dort am 7. Juli 1972 die ärztliche Prüfung. Nach neunmonatiger Tätigkeit als Medizinalassistent in der Inneren und Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Ingelheim/Rhein arbeite ich seit Mai 1973 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit begann ich im Mai 1973 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz.

